

Faculté de Pharmacie

Année 2024

Thèse N°3309

Thèse pour le diplôme d'État de docteur en Pharmacie

Présentée et soutenue publiquement

le 5 avril 2024

Par

Elisa JOUSSELIN

Couplage d'une source Probe Electro-spray Ionization à un spectromètre de masse de haute résolution (PESI-HRMS) : application à la recherche de stupéfiants dans la salive

Thèse dirigée par Franck SAINT-MARCOUX

Examineurs :

M. David Léger, président du jury

M. Franck Saint-Marcoux, directeur de thèse

Mme. Gaëlle Begaud, membre du jury

M. Eliès Zarrouk, membre du jury





Faculté de Pharmacie

Année 2024

Thèse N°3309

Thèse pour le diplôme d'État de docteur en Pharmacie

Présentée et soutenue publiquement

le 5 avril 2024

Par Elisa JOUSSELIN

Couplage d'une source Probe Electro-spray Ionization à un spectromètre de masse de haute résolution (PESI-HRMS) : application à la recherche de stupéfiants dans la salive

Thèse dirigée par Franck SAINT-MARCOUX

Examineurs :

M. David Léger, président du jury

M. Franck Saint-Marcoux, directeur de thèse

Mme. Gaëlle Begaud, membre du jury

M. Eliès Zarrouk, membre du jury



Personnel enseignant de la Faculté de Pharmacie de Limoges

Le 1^{er} septembre 2023

Doyen de la Faculté

Monsieur le Professeur COURTIOUX Bertrand

Vice-doyen de la Faculté

Monsieur LÉGER David, Maître de conférences

Assesseurs de la Faculté

Monsieur le Professeur BATTU Serge, Assesseur pour la Formation Continue

Monsieur le Professeur PICARD Nicolas, Assesseur pour l'Innovation Pédagogique

Professeurs des Universités – Hospitalo-Universitaires

M. BARRAUD Olivier	Microbiologie, parasitologie, immunologie et hématologie
M. PICARD Nicolas	Pharmacologie
Mme ROGEZ Sylvie	Microbiologie, parasitologie, immunologie et hématologie
M. SAINT-MARCOUX Franck	Toxicologie

Professeurs des Universités – Universitaires

M. BATTU Serge	Chimie analytique et bromatologie
M. COURTIOUX Bertrand	Microbiologie, parasitologie, immunologie et hématologie
M. DESMOULIERE Alexis	Physiologie
M. DUROUX Jean-Luc	Biophysique et mathématiques
Mme FAGNÈRE Catherine	Chimie organique, thérapeutique et pharmacie clinique
M. LIAGRE Bertrand	Biochimie et biologie moléculaire
Mme MAMBU Lengo	Pharmacognosie

Mme POUGET Christelle Chimie organique, thérapeutique et pharmacie clinique

M. TROUILLAS Patrick Biophysique et mathématiques

Mme VIANA Marylène Pharmacie galénique

Maitres de Conférences des Universités – Hospitalo-Universitaires

Mme. CHAUZEIX Jasmine Microbiologie, parasitologie, immunologie et hématologie

Mme DEMIOT Claire-Élise (*) Pharmacologie

M. JOST Jérémy Chimie organique, thérapeutique et pharmacie clinique

Maitres de Conférences des Universités – Universitaires

Mme AUDITEAU Emilie Chimie organique, thérapeutique et pharmacie clinique

M. BASLY Jean-Philippe (*) Chimie analytique et bromatologie

Mme BEAUBRUN-GIRY Karine Pharmacie galénique

Mme BÉGAUD Gaëlle Chimie analytique et bromatologie

M. BILLET Fabrice Physiologie

Mme BONNAUD Amélie Microbiologie, parasitologie, immunologie et hématologie

M. CALLISTE Claude Biophysique et mathématiques

M. CHEMIN Guillaume Biochimie et biologie moléculaire

Mme CLÉDAT Dominique Chimie analytique et bromatologie

M. COMBY Francis Chimie organique, thérapeutique et pharmacie clinique

Mme DELEBASSÉE Sylvie Microbiologie, parasitologie, immunologie et hématologie

M. FABRE Gabin Biophysique et mathématiques

M. LABROUSSE Pascal (*) Botanique et cryptogamie

Mme LAVERDET Betty Pharmacie galénique

M. LAWSON Roland	Pharmacologie
M. LÉGER David	Biochimie et biologie moléculaire
Mme MARRE-FOURNIER Françoise	Biochimie et biologie moléculaire
M. MERCIER Aurélien	Microbiologie, parasitologie, immunologie et hématologie
Mme MILLOT Marion (*)	Pharmacognosie
Mme PASCAUD-MATHIEU Patricia	Pharmacie galénique
Mme POUGET Christelle (*)	Chimie organique, thérapeutique et pharmacie clinique
M. TOUBLET François-Xavier	Chimie organique, thérapeutique et pharmacie clinique
M. VIGNOLES Philippe (*)	Biophysique et mathématiques

(*) Titulaire de l'Habilitation à Diriger des Recherches (HDR)

Professeur associé en service temporaire

M. FOUGÈRE Edouard	Chimie organique, thérapeutique et pharmacie clinique
---------------------------	---

Assistant Hospitalo-Universitaire des disciplines pharmaceutiques

Mme MARCELLAUD Elodie	Chimie organique, thérapeutique et pharmacie clinique
------------------------------	---

Attachés Temporaires d'Enseignement et de Recherche

M. DELMON Cédric	Microbiologie, parasitologie, immunologie et hématologie
M. HAMION Guillaume	Pharmacognosie, Botanique et Mycologie
Mme SONDA Amar	Chimie analytique et bromatologie

Enseignants d'anglais

M. HEGARTY Andrew	Chargé de cours
Mme VERCELLIN Karen	Professeur certifié

Remerciements

Au Professeur Franck Saint-Marcoux, que je remercie grandement de me faire l'honneur d'avoir dirigé cette thèse. Ce fut un immense plaisir de travailler et d'apprendre auprès de vous.

Aux professeurs Begaud et Léger, j'adresse mes remerciements pour leur aide dans la réalisation de mes études et d'avoir accepté de faire partie de ce jury.

A Elies Zarrouk, c'est un plaisir que tu aies accepté de faire partie de ce jury. Tu as rendu le travail plus agréable, je saurais me souvenir de tout ce que tu as fait pour moi. J'ai beaucoup appris avec toi, et j'ai aussi bien ris. Merci pour l'apprentissage, merci de ton aide, merci pour ta bonne humeur, merci d'être toi.

Au Professeur Pierre Marquet, je vous remercie d'avoir accepté ma venue dans le service.

A Fanny Buisson, Franck Giraudie, Alexis Pellerin, Julie Mounier, Elodie Roux et Chloé Barry, vous avez illuminé mes journées au labo, m'avez toujours été d'une aide précieuse et avez été de bon conseil.

A Amandine Ruiz, Isy Petit, « Boniface Abatan Boniface », la meilleure équipe qui soit, pas un seul jour ne passe sans que je pense à vous. Les « Tea Time » sont bien morose sans vous.

A Clémence, mon amie, les mots me manqueront certainement pour exprimer toute ma gratitude. Tu as su être là pour moi dans des moments où j'étais seule et au fond du gouffre. Tu es une amie précieuse à mon cœur et je suis fière de tout ce que tu as accompli et ton parcours, autant professionnel que personnel.

A ma chère Émilie, je suis tellement reconnaissante de t'avoir dans ma vie depuis toutes ces années. Du lycée, à manger notre pain et notre chocolat en complotant sur la fin d'un groupe, en passant par tous les concerts où l'on a dansé comme des folles, nos fous rires, nos longues discussions et jusqu'à l'arrivée de Mady.

A Romain, merci pour le soutien indéfectible. Tu rends la vie plus simple et plus belle, t'avoir à mes côtés est une chance et un bonheur immense. Et ce, même si tu triches à Mario Kart.

A David, merci t'avoir toujours été là quand je doutais, pour le soutien et pour avoir toujours répondu au téléphone quand j'en avais besoin. Merci pour tout.

A Manon et Justin, je n'aurais pas rêvé meilleur frère et soeur, merci pour le soutien pendant ces années. Merci d'avoir cru en moi et de m'avoir toujours remonté le moral dans les moments les plus difficiles. Merci aussi pour les fous rires interminables.

A Sophie et Mauricette, je suis tellement désolée que vous ne puissiez être là pour voir ce manuscrit et assister à l'accomplissement de toutes ces années d'étude. Vous avez été tellement investies dans ma réussite, c'est à vous que je dédicace ce manuscrit.

A ceux qui m'ont accompagné tout au long du chemin comme Mehdi, Bobo, Rosine, Amaury, Théo, Jules, Yeleen, Aurore, Megan, Mazarine...

Et, bien évidemment, merci à Cameron et Eggers (et un peu à Stephens) pour le QTOF.

Droits d'auteurs

Cette création est mise à disposition selon le Contrat :

« **Attribution-Pas d'Utilisation Commerciale-Pas de modification 3.0 France** »

disponible en ligne : <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>



Liste des abréviations

6-MAM : 6-monoacétylmorphine

BHE : Barrière hémato-encéphalique

BZE : Benzoylecgonine (métabolite de la cocaïne)

BZD : Benzodiazépine

CAO : Cocaïniques, amphétaminiques, opiacés et leurs dérivés

ESI : Electrospray Ionization

HRMS : Spectrométrie de masse haute résolution (*High Resolution Mass Spectrometry*)

LC : Chromatographie liquide

LDD : Limite de détection

LDQ : Limite de quantification

m/z : Rapport masse sur charge

MDA : 3,4-méthylènedioxyamphétamine (dérivé amphétaminique)

MDEA : 3,4-méthylènedioxy-N-éthylamphétamine (dérivé amphétaminique)

MDMA : Méthylène dioxymétamphétamine (dérivé amphétaminique ; Ecstasy)

MS/MS : Spectromètre de masse en tandem

MS : Spectromètre de masse

MS1 : Analyse « Full scan »

MS2 : Analyse avec fragmentation

PESI : Probe ElectroSpray Ionisation

Q1 : Premier quadripôle

QTOF : Analyseur quadripolaire combiné à un analyseur à temps de vol (*Time-Of-Flight*)

THC : Δ^9 -tétrahydrocannabinol (principe actif du cannabis)

Table des matières

I. Etat de l'art.....	15
I.1. Introduction.....	15
I.2. Effets sur le consommateur et statistiques.....	16
I.3. Analyse toxicologique.....	16
I.4. Législation.....	17
I.5. Stupéfiants et assimilés.....	18
I.5.1. Cocaïne et crack.....	18
I.5.1.1. Chimie.....	18
I.5.1.2. Pharmacocinétique.....	18
I.5.1.3. Effets.....	20
I.5.2. Amphétamines et dérivés.....	20
I.5.2.1. Chimie.....	20
I.5.2.2. Pharmacocinétique.....	21
I.5.2.3. Effets.....	21
I.5.3. Opiacés et dérivés.....	22
I.5.3.1. Chimie.....	22
I.5.3.2. Pharmacocinétique.....	22
I.5.3.3. Effets.....	23
I.5.4. Détection dans la salive.....	23
I.5.4.1. Amphétamines.....	23
I.5.4.2. Cocaïne.....	24
I.5.4.3. Opiacés.....	24
II. Travaux personnels.....	25
II.1. Contexte de la thèse et stratégie de l'étude.....	25
II.2. Probe ElectroSpray Ionization : PESI.....	25
II.3. Spectrométrie de masse haute résolution : HRMS.....	27
III. Matériels et méthodes.....	29
III.1. Appareillage.....	29
III.1.1. PESI-QTOF.....	29
III.1.2. Analyses complémentaires : LC-ESI-MS/MS.....	29
III.2. Produits et échantillons.....	29
III.2.1. Solvants et standard.....	29
III.2.2. Calibrant.....	30
III.2.3. Échantillons.....	30
III.3. Travail d'optimisation.....	31
III.3.1. Optimisation de la préparation d'échantillons.....	31
III.3.2. Synchronisation PESI - QTOF.....	31
III.3.3. Plan d'expérience.....	32
III.4. Conclusion.....	33
IV. Validation de la méthode.....	35
IV.1.1. Linéarité : création d'une gamme dynamique.....	35
IV.1.2. Détermination des limites de détection et des limites de quantification.....	35
IV.1.3. Répétabilité et reproductibilité.....	36
IV.1.4. Exactitude : comparaison à une méthode de routine.....	36
V. Résultats.....	37

V.1.1. Linéarité	37
V.1.2. Limite de détection et de quantification	39
V.1.3. Reproductibilité et répétabilité	39
V.1.4. Comparaison en LC-MS/MS.....	40
VI. Discussion	42
Conclusion et perspectives	45
Références bibliographiques.....	46
Annexes	49
Serment De Galien.....	58

Table des illustrations

Figure 1 : <i>Erythroxylon coca</i> et molécule de cocaïne.....	18
Figure 2 : Métabolisation de la cocaïne	19
Figure 3 : Crystal de méthamphétamine et molécule d'amphétamine.....	20
Figure 4 : Latex provenant d'une capsule de pavot et les molécules d'opiacés ²⁴	22
Figure 5 : Schéma du mode d'ionisation PESI	26
Figure 6 : (a) Electrospray avec un capillaire $\varnothing \sim 0,1$ mm. (b) Nanoelectrospray à l'aide d'un capillaire \varnothing de quelques μm . (c) Electropulvérisation par sonde à l'aide d'une aiguille métallique pointue (Hiraoka et al.2020)	26
Figure 7 : Signal obtenus en MS1 pour la molécule d'amphétamine à 50 ng/mL.....	27
Figure 8 : Système PESI-MS/MS de type TQ (Shimadzu®).....	27
Figure 9 : Représentation d'un spectromètre de masse haute résolution de type QTOF couplé à une source ESI.....	28
Figure 10 : Écouvillon de type FloqSwab® utilisé par les forces de l'ordre lors de contrôle routier	31
Figure 11 : Influence de la fréquence du mouvement de l'aiguille et de la durée des événements MS sur le signal, A) <i>Durée totale du mouvement de l'aiguille = 430 ms</i> ; B) <i>Durée totale du mouvement de l'aiguille = 1030 ms</i> ; C) <i>Temps d'acquisition MS = 50 ms</i> ; D) <i>Temps d'acquisition MS = 100 ms</i>	32
Figure 13 : Comparaison d'un patient positif à la cocaïne (en haut) et négatif à la cocaïne (en bas) en LC-MS/MS (à gauche) et en PESI-QT (à droite)	40

Table des tableaux

Tableau 2 : Plan des expériences réalisées.....	32
Tableau 3 : Paramètres analytiques définis pour les molécules de CAO	34
Tableau 4 : Détermination de la LDD et de la LDQ pour chaque molécules de la méthode ..	39
Tableau 5 : Résultats de reproductibilité.....	39
Tableau 6 : Résultats de répétabilité	40



I. Etat de l'art

I.1. Introduction

Lorsqu'il s'agit de la conduite au volant, l'automobiliste se doit d'être en parfaite possession de ses moyens, à la fois pour sa sécurité mais également pour la sécurité des autres usagers de la route et des piétons.

En France, toute substances pouvant significativement influencer la vigilance est encadrée par la loi. Certains médicaments sont connus pour entrainer une baisse de la vigilance, et cette dangerosité est signalée par des pictogrammes présents sur la boîte du médicament ; le médecin et le pharmacien se devant d'informer le patient des risques encourus, voire de l'impossibilité de conduire sous traitement. Cependant, c'est bien toujours la responsabilité du conducteur qui est engagée en cas de conduite sous médicament connus pour être dangereux au volant (arrêté du 28 mars 2022). Les médicaments concernés sont reconnaissables par la présence de pictogramme de niveau 1, 2 ou 3 (article R. 5121-139 du Code de la santé publique). Le niveau 1 incite à une vigilance accrue du patient lors de la prise du médicament, bien que celui-ci ne présente pas une réelle remise en cause de la conduite, une vigilance est de mise et est qualifié par la mention « Ne pas conduire sans avoir lu la notice ». *A contrario*, le niveau 2 alerte sur l'impact du traitement sur la conduite de véhicule et la mention « Ne pas conduire sans l'avis d'un professionnel de santé » souligne l'implication du médecin ou du pharmacien pour prévenir le patient du risque sur la capacité à conduire. Pour le niveau 3, le danger sur la capacité à conduire un véhicule est clairement précisé par la mention « Attention, danger : ne pas conduire. Pour la reprise de la conduite demandez l'avis d'un médecin ». Parmi les substances concernées, on retrouve les benzodiazépines, les antipsychotiques et les anesthésiques, mais aussi les opioïdes comme la morphine qui est classé niveau 2. Bien que considéré comme étant un facteur de risque moins dangereux que les substances comme la drogue ou l'alcool, ce risque lié aux médicaments représente toutefois une part significative des causes d'accidents de la route (entre 3 et 4%).¹

Mais, il existe d'autres substances présentant un réel danger pour les usagers de la route : les stupéfiants. Cependant, il n'est pas facile de définir ce qu'est un stupéfiant. Pour approcher ce qu'est un stupéfiant, il peut être utile de définir au préalable ce qu'est une drogue. Une drogue est une « substance psychotrope ou psychoactive qui perturbe le fonctionnement du système nerveux central (sensations, perceptions, humeurs, sentiments, motricité) ou qui modifie les états de conscience ». Les drogues se distinguent en plusieurs familles en fonction de l'effet sur le système nerveux : augmentation, diminution ou l'altération de son fonctionnement. On retrouve ainsi les psychotropes (cannabis, LSD, kétamine), les psychoanaleptiques (opiacés, morphine) et les psycholeptiques (cocaïne, amphétamines). Brièvement, ces drogues peuvent entrainer chez le consommateur une dépendance physique et/ou psychique et peuvent nuire à sa santé à court et long terme. Il est toutefois difficile de classer les drogues en fonction de leurs effets ou de leurs analogies chimiques, et la législation les a regroupées sous le terme de « stupéfiants », terme qui s'entend dans le langage courant comme toute substance illicite, ou bien encore, finalement, comme « une drogue ». Ainsi, l'arrêté du 22 février 1990 fixe la liste de l'ensemble des molécules inscrites sur la liste des substances classées comme stupéfiants (Annexe 1, modifiée le 17 octobre 2019). On y retrouve notamment quatre grandes familles: les cannabiniques, les amphétaminiques, les opiacés et les cocaïniques.² Un stupéfiant est donc bien une substance inscrite sur une liste

de molécules soumises à législation. Brièvement, en France, l'article L. 628 issu de la loi n°70-1320 du 31 décembre 1970, énonce que « seront punis [...] ceux qui auront, de manière illicite, fait usage de l'une des substances ou plantes classées comme stupéfiants », et plus largement qu'en acheter, en consommer, en détenir, en donner, en revendre, en produire, en transporter ou conduire après en avoir consommé, sont des infractions à la loi.

Notons que le terme de stupéfiant prend son origine dans le fait que la première substance illicite fut la morphine et que par extension les produits stupéfiants ont été d'abord ceux présentant des effets proches des opiacés, dont un effet « stupéfiant », c'est-à-dire un effet narcotique (endormissement) ; les pays anglosaxons regroupant les produits sous le terme de « narcotics ». Il est intéressant de noter qu'il n'existe pas d'incrimination directe pour la conduite sous influence de médicaments stupéfiants (au sens « législation pharmaceutique » du terme).

Lors de contrôle routier, on recherche la présence, même sous forme de trace, justifiant un usage par le conducteur. En se référant à l'article L 235-1 du Code de la route, il est bien spécifié que l'on recherche l'usage, puisqu'il est prohibé, indépendamment de la concentration : « toute personne qui conduit un véhicule ou qui accompagne un élève conducteur alors qu'il résulte d'une analyse sanguine ou salivaire qu'elle a fait usage de substances ou plantes classées comme stupéfiants est punie de deux ans d'emprisonnement et de 4500 euros d'amende ».¹

La plupart des pays européens, comme la France, ont aujourd'hui légiféré le dépistage sur le bord de la route des conduites sous influence. La Société Française de Toxicologie Analytique (SFTA) a publié en 2016 un consensus pour homogénéiser les résultats rendus par les laboratoires de toxicologie ayant trait à la confirmation d'une présence de stupéfiants dans le sang dans le cadre de la sécurité routière. Ce consensus précisait les concentrations attendues, les fenêtres de détection, l'influence du mode de recueil et l'évaluation de la contamination passive.³

I.2. Effets sur le consommateur et statistiques

Il ressort clairement que les drogues sont fréquemment détectées chez les conducteurs impliqués dans des accidents. Une somnolence, des troubles psychomoteurs, troubles cognitifs et des performances, baisse de l'attention, de la perception et de la mémoire, sont observés comme effets négatifs influençant la conduite.⁴ Selon le site de sécurité routière du gouvernement, 23% des personnes décédées sur les routes en 2015 ont trouvé la mort dans un accident impliquant un conducteur positif aux stupéfiants. La consommation de stupéfiants concernant avant tout les jeunes conducteurs et majoritairement les hommes. Exception faite pour l'amphétamine pour lequel il existerait une consommation plus importante chez les femmes.^{5,6}

I.3. Analyse toxicologique

La recherche et/ou le dosage de stupéfiants peut être effectuée dans de multiples contextes de toxicologie clinique ou de toxicologie médico-légale. Brièvement, la toxicologie clinique peut être vue comme tout contexte dans lequel un médecin prescrit une analyse, alors que la toxicologie médico-légale correspond aux demandes émanant d'une autorité judiciaire (ex : un

juge ou un Officier de Police judiciaire établit une réquisition demandant telle ou telle analyse). Dans les deux cas, l'analyse peut *a minima* mettre en évidence un usage illicite de stupéfiants.

Pour l'UF de toxicologie biologique et médico-légale du CHU de Limoges, l'activité de recherche et dosage de stupéfiants dans un contexte médico-légale est quotidienne. Les matrices utilisées sont multiples. Pour la recherche de drogues, il peut s'agir de sang, de sérum, de salive, d'urine ou encore de cheveux.⁷

I.4. Législation

Cette activité est pour partie effectuée dans le cadre dit « de contrôle routier ». Plus précisément, l'article L.235-1 du code de la route, issu de la loi du 18/06/1999 relative à la sécurité routière (loi n°99-505) implique une recherche de stupéfiants chez tout conducteur impliqué dans un accident mortel. Depuis 2001, cette loi a évolué et implique désormais une recherche de stupéfiants chez tout conducteur ou accompagnants d'élève-conducteurs impliqué dans un accident corporel, dans une infraction entraînant une suspension de permis, ou encore, une infraction liée au port de la ceinture, du casque ou à la vitesse. Néanmoins un dépistage peut être réalisé même en l'absence d'infraction, d'accident ou de raisons de soupçonner un usage de stupéfiant et peut se faire arbitrairement selon l'article L 235-2 du code de la route issu de la loi n°2019-222 datant du 23 mars 2019.⁸

Bien que le dépistage salivaire en bord de route soit réalisé depuis 2008 en France en complément du dépistage urinaire, une confirmation dans le sang a longtemps été obligatoire, imposant aux forces de l'ordre l'intervention d'un médecin pour effectuer le prélèvement sur le mis en cause. Cependant, l'arrêté du 13 décembre 2016 a mis en place des analyses quasi-systématique dans la salive lors de contrôle routier (Annexe 2). L'analyse dans la matrice salivaire présente plusieurs avantages : (i) le prélèvement est facile d'accès et peut se faire sous surveillance, limitant ainsi les possibilités de falsification ; (ii) il permet également de procéder à un dépistage par les forces de l'ordre grâce à des dispositifs immuno-chromatographiques pour la recherche des 4 familles de stupéfiants : cannabiniques, amphétaminiques, cocaïniques et opiacés.

Au 1^{er} mars 2024, en cas de dépistage positif, l'arrêté du 13 décembre 2016 prévoit une vérification de ce test par écouvillon salivaire de type *FloqSwab*[®] qui est envoyé sous scellé dans un laboratoire autorisé à prendre en charge des analyses dans un cadre médico-légal. L'arrêté précise également que l'échantillon salivaire doit être analysé par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS) avec des seuils de détection de 10 ng/mL pour chaque stupéfiant (exception faite du THC à 1 ng/mL). On admet aujourd'hui que la salive soit une matrice permettant de révéler une consommation récente de stupéfiants.⁹

Pour ce seul contexte de recherche et dosage salivaire de stupéfiants dans le cadre de la conduite automobile, l'activité de l'UF de toxicologie biologique et médico-légale du CHU de Limoges est d'environ 2000 à 2500 dossiers annuels.

I.5. Stupéfiants et assimilés

I.5.1. Cocaïne et crack

I.5.1.1. Chimie

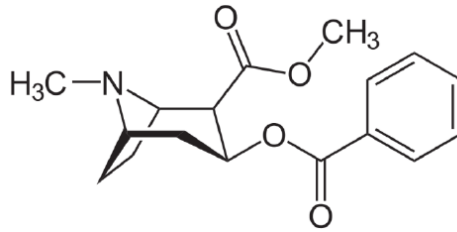


Figure 1 : *Erythroxylon coca* et molécule de cocaïne

La cocaïne ($C_{17}H_{21}NO_4$) est un alcaloïde sympathomimétique naturel retrouvé dans la plante *Erythroxylon coca*. Elle se présente sous la forme d'une poudre cristalline transparente, sans odeur et hygroscopique avec goût amer.¹⁰

La cocaïne possède de nombreux résidus de solvants organiques qui la rendent difficilement consommable, d'où la nécessité d'une étape de purification. Après préparation, on obtient des cristaux blancs légèrement amers appelé « chlorhydrate de cocaïne » ou « neige » qui est la forme de consommation la plus courante. Souvent utilisée par voie intranasale mais rarement injectée.

Le « crack », autre forme de la cocaïne, est un produit de précipitation à chaud du produit qui se présente par la suite sous la forme de « galette » solide qui est ensuite effrité en morceaux dur en forme de « cailloux ». Le crack est consommé par inhalation après chauffage du produit.

La cocaïne est un ester d'acide benzoïque qui était utilisé à l'origine comme anesthésiant local, il n'est plus utilisé en raison de son grand potentiel addictif. Elle était également utilisée comme stimulant en Amérique du Sud depuis plus de 5 000 ans, sous forme de feuilles à mâcher ou de thé à infuser.¹¹

I.5.1.2. Pharmacocinétique

Absorption

L'absorption de la cocaïne varie énormément en fonction de sa voie d'administration. Quelle soit sous forme de poudre cristalline ou sous forme de « crack », elle peut être administrée de différentes manières : par voie inhalée, intranasale, orale ou intraveineuse.

La voie la plus commune reste la voie respiratoire, la poudre est « sniffée » et le crack est fumé, la voie respiratoire est privilégiée pour ses effets rapides au niveau cérébrales en 6 à 8 s.

La voie intranasale réduit l'administration du produit par l'effet vasoconstricteur de celui-ci qui augmente le délai de 60 minutes pour atteindre le pic de concentration plasmatique.

La voie intraveineuse est utilisée pour le chlorhydrate de cocaïne dissous dans une solution aqueuse, et possède la même biodisponibilité que la voie inhalée. Elle permet des effets très rapides, quasi instantanés.

Enfin, il existe une administration au niveau de la muqueuse buccale, vaginale ou rectale, bien que la biodisponibilité des telles voies soit faible, elle est associée à des effets plus longs allant jusque 1 à 2h.^{8,10}

Distribution

La biodisponibilité de la cocaïne est rapide dans les tissus, la molécule se lie aux albumines et aux glycoprotéines à 90% et est présente en forte concentration dans le cerveau, les poumons, les reins, le sang, le cœur et les tissus musculaires. La cocaïne possède un temps de $\frac{1}{2}$ vie de 40 à 90 min, variable selon les modes d'administration.

Métabolisme

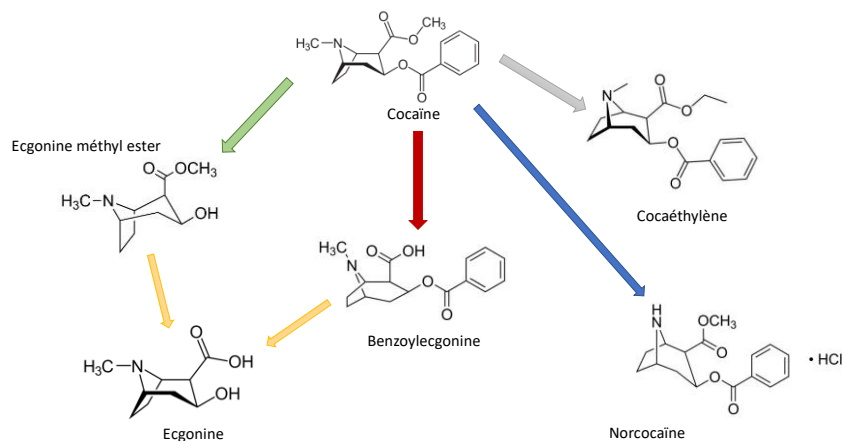


Figure 2 : Métabolisation de la cocaïne

La cocaïne possède plusieurs métabolites : l'ecgonineméthylester (EME) et la benzoylecgonine (BZE), qui sont inactifs, et la norcocaïne, qui est active.

La BZE peut être hydrolysée spontanément à pH physiologique au niveau de la fonction méthylester de la partie ecgonine de la cocaïne. Il existe également une voie enzymatique par l'intermédiaire des carboxylestérases hépatiques de type 1. Sa demi-vie d'élimination plasmatique est comprise entre 4 et 7h et on la retrouve jusqu'à 24h dans le sang et 40 à 60h dans les urines. Au vu de ces caractéristiques, elle est fréquemment utilisée comme marqueur de consommation de cocaïne. Inactif, il ne traverse ni la barrière hémato-encéphalique ni le placenta.

L'EME est formé dans le foie et le plasma, notamment par les carboxylestérase de type 2. Bien que présente à plus faible concentration que la BZE, il est considéré comme métabolite majeur.

La BZE et l'EME vont ensuite se métabolise en ecgonine qui apparaît tardivement mais reste bien plus longtemps dans les urines (jusqu'à 98h).

La cocaïne peut également subir une N-déméthylation au niveau du foie par le CYP450 qui génère la norcocaïne, métabolite actif, hautement hépatotoxique et cardiotoxique, capable de traverser la barrière hémato-encéphalique.

Absorbée avec l'alcool, il forme le cocaéthylène et prolonge de ce fait le temps de demi-vie puisque l'alcool consommé diminue l'activité des carboxylestérases hépatiques de type 1 et 2.⁸

I.5.1.3. Effets

Puissant inhibiteur de la recapture de la dopamine, elle semble libérer ce neurotransmetteur et augmenter ainsi sa neurotransmission de manière aiguë. Cependant en cas d'administration répétée, elle entraîne une réduction des concentrations de dopamine au niveau du système nerveux central.

La cocaïne est un psychostimulant puissant dose-dépendant et dont l'effet dépend de la voie d'administration. L'euphorie causé pour la consommation de drogues confère un sentiment de toute puissance au consommateur qui va jusque ne plus ressentir la douleur ou la fatigue. Elle désinhibe et peut stimuler le désir sexuel chez les consommateurs naïfs. La descente provoque chez les consommateurs une agressivité qui est plus importante chez les consommateurs de « crack ». Sur le plan physiologique, on retrouve des symptômes comme une tachycardie, une mydriase, une hypertension artérielle, sueurs et frissons, nausées, vomissement et une confusion mentale. De forte dose sont associés à de l'hyperthermie, une rhabdomyolyse, un choc et des lésions hépatiques aiguës, qui peuvent être graves, voire mortelles.¹²

I.5.2. Amphétamines et dérivés

I.5.2.1. Chimie

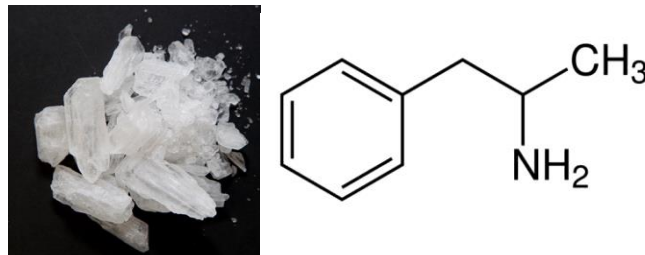


Figure 3 : Crystal de méthamphétamine et molécule d'amphétamine

Les amphétamines sont des psychostimulants, produits synthétique utilisés de manière illicite dans les milieux festifs et sportifs comme dopant ou coupe-faim. En pharmacologie, on le retrouve notamment dans le traitement des troubles déficitaires de l'attention avec ou sans hyperactivité (TDAH).

L'amphétamine est le chef de file des amphétaminiques et est disponible en milieu festif sous forme de poudre, de comprimés ou sous forme de « cristal ».

La méthamphétamine, connu sous le nom de « cristal », « speed » ou encore « meth » est utilisée sous sa forme hydrate.

La MDMA également connu sous le nom « d'ecstasy » est entactogènes. Disponible sous la forme de comprimé, gélules, poudre « sniffée », ou cristaux, est beaucoup retrouvé dans le milieux « techno » également.

La MDEA, appartient à la famille des entactogènes également, elle est retrouvée dans les comprimés d'ecstasy à hauteur de 20% environ.

La MDA, plus connu sous le nom de « love drug », appartient aux entactogène et peut avoir des effets hallucinogènes. Il s'agit aussi d'un métabolite de la MDMA ou de la MDEA.^{8,13}

I.5.2.2. Pharmacocinétique

Administration

Les amphétaminiques sont rapidement absorbés pour voie orale, et est totalement absorbé au niveau intestinal sous forme de sulfate. Pour l'amphétamine, le pic plasmatique apparaît en 2 à 4h tandis que pour la méthamphétamine il est de 3,6h environ et de 2h pour la MDMA. La MDMA est absorbé au niveau intestinale en 20 à 60 min. Son métabolite, la MDA, atteint son pic en 6h après injection.^{8,14}

Métabolisme

La méthamphétamine se métabolise en amphétamine et en 4-hydroxyméthamphétamine. L'amphétamine se métabolise en phénylacétone, en acide benzoïque puis en acide hippurique. La MDMA, quant à elle, présente deux voies métabolique : une déméthylation et une N-déalkylation. La déméthylation serait catalysée par les cytochromes CYPD1/6 ou CYP3A2/4 et CYP1A2. En parallèle, ces voies métaboliques peuvent se former d'autres métabolites qui seraient potentiellement hépatotoxique et neurotoxiques.^{8,14}

Élimination

L'excrétion des amphétamines est essentiellement urinaire, l'amphétamine apparaît en 20 min après consommation sous la forme inchangée ou sous la forme de métabolites désaminés. La durée de détection est d'environ 4 jours. On peut néanmoins retrouver l'amphétamine comme métabolite de la méthamphétamine en 24h, mais la forme inchangée reste celle qu'on retrouve le plus au niveau urinaire. On retrouve la méthamphétamine pendant 7 jours dans les urines contre 72 h pour la MDMA.⁷

I.5.2.3. Effets

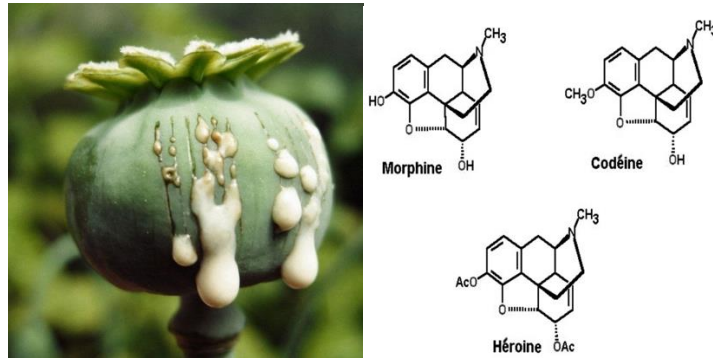
Les amphétaminiques ont un effet stimulant sur le système nerveux central, agoniste dopaminergique indirect et non sélectif. Elle est responsable de l'augmentation de la concentration catécholamines tel que l'adrénaline, la noradrénaline, la sérotonine et principalement la dopamine. Elle entraîne ainsi une augmentation de la vigilance, des performances et de la concentration.

Les entactogènes comme la MDMA, la MDEA ou la MDA provoque des effets psychotropes fugace marqués par la libération de sérotonine (5HT).

Les amphétaminiques sont responsables d'un sentiment de bien-être et d'euphorie, mais aussi de la diminution du sentiment de fatigue allant jusqu'à la privation de sommeil. En effet secondaires on peut retrouver : irritabilité, nervosité, céphalées, akinésie, perte d'appétit, sudation, augmentation de la libido et compulsivité.^{8,14}

I.5.3. Opiacés et dérivés

I.5.3.1. Chimie



Parmi les opiacés, on retrouve les opiacés naturels, extrait du pavot sous la forme d'un latex blancs dans lequel on retrouve une quarantaine d'alcaloïde. On retrouve ces substances dans les prescriptions contre la douleur mais également pour les dépendances majeurs lié aux opiacés. Cette famille regroupe des substances tel que l'héroïne, la méthadone, la buprénorphine, l'oxycodone, la codéine, le fentanyl ou encore la morphine. ¹⁵

La morphine est un analgésique naturel qui soulage les douleurs intenses ou rebelles d'origine néoplasique, son usage peut également être illicite bien que rare.

L'héroïne (diacétylmorphine) est un opiacé hémisynthétique utilisé pour ses effets stupéfiants. Utilisé sous forme de sel, sa solubilité dans l'eau le rend facile d'administration par voie intraveineuse. Il est considéré comme étant trois fois plus fort que la morphine à dose égale avec des effets remarqué comme plus brutaux que ceux de la morphine. ¹⁶

I.5.3.2. Pharmacocinétique

Administration

L'administration se fait principalement par voie intraveineuse, apprécié pour ses effets plus rapide, elle peut néanmoins se substituer par une utilisation par voie sous-cutanée ou nasale « sniff » voir par inhalation. Cependant, la voie intraveineuse comporte des risques d'infection virale (hépatite, VIH, etc..) lors d'échange de seringue entre plusieurs sujets. La voie orale est possible pour la morphine, avec une biodisponibilité de 30-40% mais possède un effet analgésique médiocre. ^{8,17}

Distribution

Bien que moins liposoluble que l'héroïne, la morphine se distribue dans tout l'organisme avec un volume de distribution compris entre 2,1 à 4,0 L/kg tandis que l'héroïne possède un plus large volume à 25,0 L/kg. Le pic plasmatique est atteint en 1 à 1,5h pour la morphine et en 5 min environ pour l'héroïne, soit en même temps que son métabolite, la 6-monoacétylmorphine (6-MAM). Les deux molécules pénètrent tous les organes sans s'y accumuler et traversent facilement et rapidement la BHE, l'héroïne plus rapidement que la morphine du fait de son caractère lipophile, ce qui rend sa consommation plus intéressante pour les sujets. ^{8,17}

Métabolisme

La morphine et l'héroïne sont métabolisées dans le foie, respectivement par glucuroconjugaison, qui produit la morphine-6-glucuronide (50 fois plus actif que la substance mère) et la morphine-3-glucuronide, et par déacétylation de la 6-MAM en morphine. La 6-MAM possède une demi-vie de 20min environ contre 1,5 à 3h pour la morphine, c'est ce qui rend également les effets de l'héroïne plus intense et plus agréable au niveau du tissu nerveux. La morphine se métabolise à hauteur de 90% en métabolite par métabolisme de premier passage important entraînant une forte production de métabolite lors d'injection. ^{8,17}

Élimination

L'élimination des opiacés se fait principalement par voie urinaire (70 à 90%) en 24h et reste détectable dans les urines pendant 7h à 12h. ^{8,17}

I.5.3.3. Effets

Les opiacés en général, agissent préférentiellement sur les récepteurs mu, kappa et, plus faiblement, les récepteurs sigma et ont une activité agoniste provoquant chez le consommateur : analgésie, sédation, myosis, euphorie, dépression respiratoire. L'héroïne ne constitue cependant pas un bon agoniste pour ces récepteurs, mais elle permet de faciliter le passage de ses métabolites comme la 6-MAM à travers la BHE (d'où des effets plus rapide et intense que pour la morphine).

Les opioïdes possèdent néanmoins des effets secondaires non négligeables comme la dysphorie, les nausées et vomissements, principalement lors de première consommation. On note également une perte d'appétit, constipation, une sensation de chaleur de la peau et des démangeaisons. Les signes cliniques se caractérisent par un myosis important, une fréquence respiratoire réduite mais, également, une température corporelle basse et une sécheresse buccale. L'héroïne serait également responsable d'une altération de l'acuité visuelle et de la réponse au stimuli (jugement, concentration, mémoire).

A forte dose, le sujet peut ressentir un ralentissement se traduisant par une tendance à s'endormir. En fonction de la dose et de la tolérance, la dépression respiratoire peut s'aggraver pouvant aller jusqu'au coma bien souvent mortel. L'overdose semble survenir chez la personne lors d'une consommation concomitante d'alcool à forte dose et d'héroïne.

Le consommateur régulier va ressentir une perturbation continue du psychisme se traduisant par des réactions paranoïaques, de grandes variations de l'état de conscience, des comportements asociaux, agressifs, dépressifs voir même suicidaires. ^{7,24}

I.5.4. Détection dans la salive

I.5.4.1. Amphétamines

Pour l'amphétamine et la méthamphétamine, la détection se fait pendant environ 2 jours après administration. Cette durée de détection est très probablement favorisée par la fonction aminée et le caractère liposoluble des molécules.

Il est néanmoins possible de retrouver de l'amphétamine dû à la métabolisation de médicaments comme le traitement du TDAH, la ritaline, contenant un produit de la famille des amphétamines : le méthylphénidate chlorhydrate.⁸

I.5.4.2. Cocaïne

La détection de la cocaïne dans la salive est moins longue que pour l'amphétamine, elle se détecte entre 4 et 12h après peu importe le mode d'administration mais elle est cependant éliminée rapidement. La BZE et l'EME sont détecté 1h après administration avec des demi-vies d'élimination plus longues de 3.4 à 13.8h pour la BZE et 2.4 à 15.5h pour l'EME.¹⁹

I.5.4.3. Opiacés

Quel que soit l'administration utilisée (intraveineuse, nasale, inhalée), l'héroïne reste dans la salive pendant 1h, tandis que son métabolite 6-MAM est détecté pendant 1 à 4h. La morphine peut être détectée, quant à elle, pendant 12h dans la salive en moyenne.⁸

II. Travaux personnels

II.1. Contexte de la thèse et stratégie de l'étude

Dans un contexte médico-légal et dans un contexte clinique, où les résultats sont bien souvent attendus en urgence, une méthode d'analyse pour la recherche et le dosage des produits stupéfiants, doit d'être à la fois, rapide, spécifique et sensible.

Nos travaux avaient pour objectif de développer une méthode de recherche et dosage des produits stupéfiants dans la salive par le couplage une source *Probe ElectroSpray Ionization* (PESI) à un spectromètre de masse (MS) haute résolution (HR) de type Q-TOF (Time-of-flight).

Le travail présenté dans ce manuscrit met en avant la validation et l'application de cette méthode analytique ainsi que le travail d'optimisation réalisé en amont.

J'ai réalisé ma thèse au sein du service de pharmacologie, toxicologie et pharmacovigilance du CHU de Limoges. Depuis plusieurs années, ce laboratoire est lié contractuellement avec la société Shimadzu® au titre de « *Innovative Center* ». Brièvement, des développements analytiques sont réalisés au sein du service en faisant appel à des systèmes d'analyse encore en cours de développement ou de commercialisation par la société Shimadzu®. Ainsi, le couplage PESI-HRMS dont il est question dans ce manuscrit est une innovation analytique.

Plus précisément, ces travaux ont été menés au sein de l'Unité Fonctionnelle de Toxicologie médico-légale (sous la responsabilité du Dr Souleiman El Balkhi et du Pr Franck Saint-Marcoux), dont une des activités est la recherche et le dosage de stupéfiants dans les matrices biologiques et les organes. Ce secteur d'analyse est accrédité par le Comité Français d'Accréditation (COFRAC) selon la norme ISO 15189 dédiée à la Biologie Médicale (matrices biologiques) depuis 2008. Cette accréditation reconnaît à la fois la compétence technique et l'impartialité d'un organisme pour mener des tâches particulières. Brièvement, ces normes encadrent les aspects pré-analytiques, analytiques et post-analytiques ; soit, en d'autres termes, toutes les étapes d'une analyse depuis la réception d'un échantillon jusqu'au rendu du résultat.

II.2. Probe ElectroSpray Ionization : PESI

Nos travaux ont fait appel à une source d'ionisation ne nécessitant pas de système de séparation chromatographique. L'avantage plus que séduisant d'une analyse rapide, en moins de deux minutes, sans préparation d'échantillon, a suscité l'intérêt de pouvoir mettre en place un tel outil analytique en routine ; notamment dans un contexte médico-légal.

La source PESI a été introduite pour la première fois par Hiraoka et al. en 2008.²⁰ Elle se présente comme une miniaturisation de l'ionisation ESI dans laquelle le capillaire du nano-électrospray converge vers une aiguille solide avec une pointe d'une centaines de nanomètres (environ 700 nm). Ce mode d'ionisation permet de s'affranchir de la séparation par chromatographie et, ainsi, d'obtenir une analyse ultrarapide avec peu voire pas de préparation d'échantillon.²¹

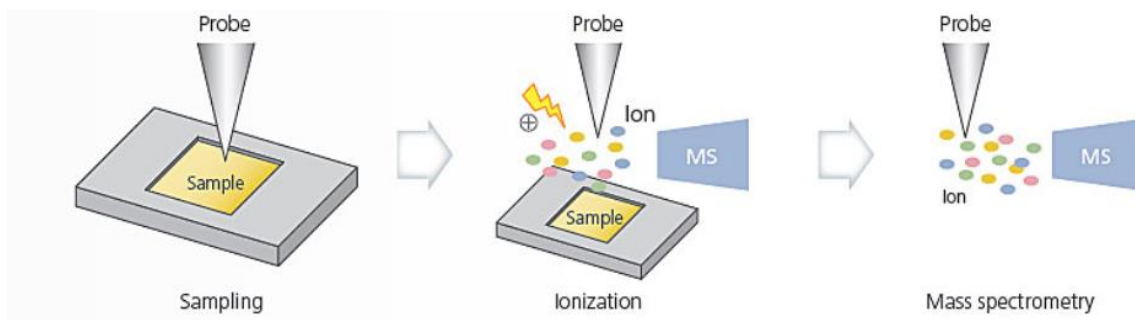


Figure 5 : Schéma du mode d'ionisation PESI

Plus précisément, la PESI se compose en deux parties : une aiguille en acier inoxydable, propre et hydrophile et une plaque pour le dépôt de l'échantillon. L'échantillon est déposé en petite quantité (10 μL) sur une plaque de polypropylène sur laquelle est creusé un puit qui est placé ensuite sur une platine de manipulation sur l'axe x-y-z. L'aiguille placée dans la source perpendiculairement à l'entrée du spectromètre de masse sur un axe verticale avec un système actionné par un moteur linéaire, prélève l'échantillon en surface sur une profondeur d'environ 0,5 mm pendant environ 50 ms. L'aiguille est soumise à un voltage compris entre 1 et 3 kV, pour permettre l'ionisation de l'échantillon lorsqu'elle effectue ses mouvements de haut en bas. Quand l'aiguille est en position basse, l'échantillon est prélevé en se déposant à la surface de l'aiguille, et, quand l'aiguille est en position haute, l'échantillon est ionisé.²²

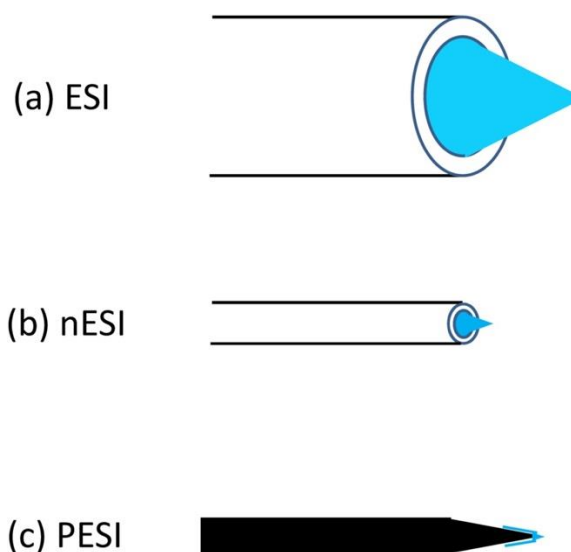


Figure 6 : (a) Electrospray avec un capillaire $\varnothing \sim 0,1$ mm. (b) Nanoelectrospray à l'aide d'un capillaire \varnothing de quelques μm . (c) Electropulvérisation par sonde à l'aide d'une aiguille métallique pointue (Hiraoka et al.2020)

Le mécanisme d'ionisation se fait à l'image d'une ionisation à l'aide d'une source ESI, les molécules de l'échantillon sont orientées vers le spectromètre de masse en formant un cône de Taylor. Les gouttelettes chargées, ainsi formées, se désolvent jusqu'à ce que les forces de répulsions coulombiennes excèdent les forces de cohésion des gouttelettes, ce qui forme des microgouttelettes chargées puis des ions qui seront ensuite analysés par le spectromètre de masse.²²

Le mouvement de va-et-vient de l'aiguille donne au signal obtenu l'allure d'un « peigne d'acquisition » représentant une succession d'ionisation de l'échantillon, cette forme d'acquisition se rapproche d'une représentation d'un XIC (extracted courant ion). Ainsi, le sommet du pic représente l'ionisation de l'échantillon et le retour à la base du pics représente le prélèvement de l'échantillon par l'aiguille.

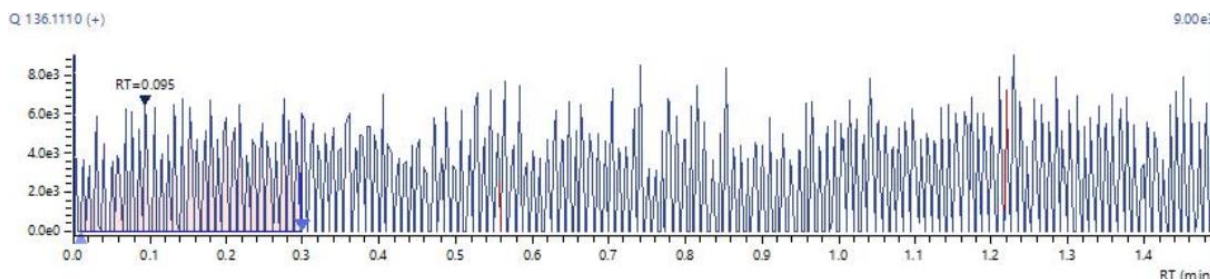


Figure 7 : Signal obtenus en MS1 pour la molécule d'amphétamine à 50 ng/mL

Le premier couplage optimisé dans le service du CHU de Limoges comprenait une source PESI associée à un spectromètre de masse en tandem de type triple quadripôle. Le système utilisé était un triple quadripôle de type « 8050 » de la société Shimadzu®.



Figure 8 : Système PESI-MS/MS de type TQ (Shimadzu®)

II.3. Spectrométrie de masse haute résolution : HRMS

Le spectromètre de masse haute résolution utilisé était un système hybride combinant un analyseur quadripolaire avec un analyseur à temps de vol (TOF ; Time-Of-Flight).

Brièvement, son fonctionnement est le suivant : l'analyseur quadripolaire isole un type d'ion par l'utilisation d'un champ magnétique en fonction de son rapport masse sur charge (m/z). L'ion placé dans un champ quadripolaire, pénètre dans l'espace délimité par quatre barres cylindriques dans lequel il va être soumis à un potentiel électrique. L'analyseur quadripolaire comporte quatre barres métalliques parallèles longues repartis en deux jeux d'électrodes opposés de potentiel électriques positif et négatif. Les analyseurs ont pour propriété de globalement focaliser la trajectoire des ions au centre du quadripôle. Le champ alternatif initié par les barres positives et négatives fait « tourner » ce puits et ce sommet de potentiel. Les ions résonnant sont entraînés par la suite vers la cellule de collision tandis que les ions non-résonnant sont éliminés en se fracassant sur les électrodes.

La cellule de collision a pour rôle de créer une interaction ion-neutre avec un gaz inerte. Lors de la collision entre les ions et le gaz inerte, seule une fraction de l'énergie cinétique initiale

de l'ion incident est transformée en énergie interne et l'ion ainsi activé se fragmente en ion-fils de masse différente

Les ions fragmentés vont ensuite se diriger vers le deuxième analyseur, « le TOF ». Le principe de cet analyseur est simple : il repose sur la mesure du temps nécessaire pour les ions à parcourir un tube de vol avant d'arriver au détecteur.

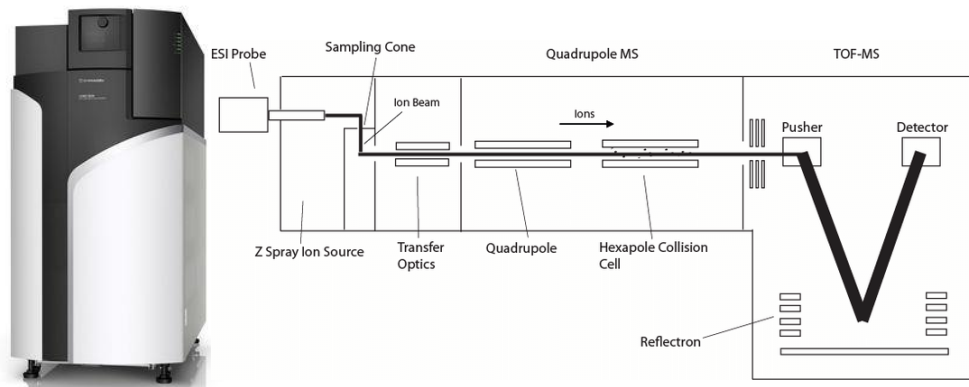


Figure 9 : Représentation d'un spectromètre de masse haute résolution de type QTOF couplé à une source ESI

Les ions sont transportés à des vitesses inversement proportionnelles à leur rapport m/z . Ainsi, les ions plus lourds mettront davantage de temps à atteindre le détecteur que les ions plus légers. De manière itérative, il y a un remplissage dans le « Pusher » (voir figure 9) au travers du modulateur. A ce niveau, un des principaux fondamentaux est le suivant : le pusher se remplit, puis libère les ions accumulés dans le TOF, tout en stoppant simultanément son remplissage pendant cette étape. En d'autres termes, cette approche permet de transmettre 100% des ions entrant par paquets, sans perte d'ions, grâce au blocage effectué lorsqu'il atteint un quota d'ions à envoyer dans le TOF. Dans le TOF, les ions cheminent au travers du réflectron qui permet de réajuster le temps de vol d'ions de même masse mais ayant des énergies cinétiques différentes, afin qu'ils atteignent simultanément le détecteur. Au total, on peut ainsi estimer le rapport m/z d'un ion car sont connus, la durée du trajet de l'ion dans le TOF, la longueur du TOF et la tension d'accélération appliquée à l'ion.²³

L'un des principaux avantages d'un outil HRMS est qu'il permet de distinguer des composés isobariques en utilisant la masse exacte ; à la différence de la spectrométrie de masse de basse résolution qui permet de distinguer uniquement des composés ayant une masse nominale différente. La notion de masse exacte est très importante, elle donne la possibilité de gagner en spécificité en éliminant les possibles interférences et les faux positifs.²⁴ Par exemple, dans le laboratoire du CHU de Limoges, la HRMS est fréquemment utilisée comme outil de confirmation de la présence d'une molécule lorsqu'une méthode de screening en basse résolution l'a identifié de façon « douteuse ».

III. Matériels et méthodes

III.1. Appareillage

III.1.1. PESI-QTOF

Le système d'analyse était composé d'une source PESI, couplée à un spectromètre de masse haute résolution de type QTOF, modèle LCMS-9030[®] de la société Shimadzu[®] utilisé en mode positif.

Les paramètres de la source ont été ceux définis a priori^{25,26} : le volume d'échantillon prélevé a été paramétré était de 10 µL; la position de la plaque dédiée était réglé à -46mm (correspondant à la différence entre la position basse et la position haute de l'aiguille); le temps passé dans l'échantillon lorsque l'aiguille est en position basse : 30ms; le voltage appliqué à l'aiguille était de 2,3 kV; la vitesse de l'aiguille était de 400 ms; la *Desolvation Line* était réglée à 250°C et le *Heat Block* à 50°C.

III.1.2. Analyses complémentaires : LC-ESI-MS/MS

La méthode sur LC-ESI-MS/MS est la méthode utilisée usuellement en routine au laboratoire Elle a servi de comparateur à la méthode que nous développons. La méthode analytique et la préparation d'échantillon à base de sels QuEChERS utilisé au sein de l'unité a fait l'objet d'une publication.²⁷ Cette méthode est réalisée sur un système de chromatographie liquide LC-30 AD Nexera X2 de la société Shimadzu[®] et d'une source ESI (electrospray ionization) couplé à un spectromètre de masse en tandem de type triple quadripole modèle 8050 de la société Shimadzu[®]. Le gradient utilisé était (A) eau, formiate d'ammonium à 2mM/0,002% tampon acide formique et (B) méthanol, formiate d'ammonium à 2mM/0,002% tampon acide formique.

III.2. Produits et échantillons

III.2.1. Solvants et standard

Pour la réalisation de ce travail, le choix des molécules à étudier s'est porté sur un total de 9 molécules toute présente sur la liste des stupéfiants à rechercher. Les différentes molécules et étalons internes utilisés ont été obtenus auprès des laboratoires Cerilliant (Round Rock, TX, USA) et LGC (Molsheim, France) et sont présentées dans le tableau 1.

Tableau : Molécules de CAO et étalons interne compris dans la méthode d'analyse

Molécules CAO	Molécules d'étalon interne
6-monoacétylmorphine	6-monoacétylmorphine-D3
Amphétamine	Amphétamine-D5
Benzoylécgonine	Benzoylécgonine-D3
Cocaïne	Cocaïne-D3
EME	EME-D3
MDA	MDA-D5
MDEA	MDEA-D5
MDMA	MDMA-D5
Méthamphétamine	Méthamphétamine-D5

Ces molécules de la famille des cocaïniques, des amphétamines et des opiacés sont regroupées sous le terme CAO.

Les solutions mères ont été préparées à 1 g/L soit dans de l'acétonitrile soit dans du méthanol. Les solutions ont été conservées à -20°C pendant 12 mois.

L'éthanol a été obtenu auprès du laboratoire Carlo erba (Val de Reuil, France), le méthanol auprès du laboratoire Fisher chemical (Illkrich, France), le formiate d'ammonium auprès de Bioserv (Morangis, France). L'eau désionisée était produite par un système millipore interne au laboratoire.

III.2.2. Calibrant

L'élément le plus important du système est sa capacité à mesurer les composés avec une grande précision de masse. Pour y parvenir, des étapes de calibration sont nécessaires. L'une d'entre elle consiste en une calibration du TOF par injection d'une solution de NaI dans la chambre d'ionisation avant chaque série d'échantillon. Toutes les données récoltées durant cette étude remplissaient le critère d'identification d'erreur de masse inférieur à 5 ppm. L'erreur de masse est calculée par la différence entre la masse exacte et la masse mesuré de 2 ions, incluant l'ion précurseur et de son fragment.

III.2.3. Échantillons

Une partie des échantillons utilisés dans le cadre de ce travail de thèse ont été obtenus auprès de « volontaires » : personnel du laboratoire ayant accepté de donner un prélèvement de leur salive dans le cadre de mes travaux. Ces échantillons ont servi de matrice vierge.

Une autre partie était issue de l'activité de routine du laboratoire. Il s'agissait de reliquats de prélèvements parvenus au laboratoire pour une recherche de stupéfiants dans le cadre de contrôles routiers. Ces échantillons salivaires étaient obtenus à partir des écouvillons de type « FloqSwab® » (voir paragraphe I.4 de l'Introduction) permettant la collection de salive et de cellules buccales en frottant l'intérieur des joues, les gencives et la langue pendant quelques minutes afin de récolter des cellules buccales²⁸⁻³⁰.



Figure 10 : Écouvillon de type FloqSwab® utilisé par les forces de l'ordre lors de contrôle routier

III.3. Travail d'optimisation

L'optimisation d'une méthode est une étape essentielle et répondant à un cahier des charges. L'approche choisie ici était une méthode séquentielle, c'est-à-dire que nous avons choisi de faire varier les différents paramètres simultanément et d'en déterminer les paramètres optimaux.

Les paramètres choisis étaient les suivants : la préparation d'échantillon, les paramètres propres à l'aiguille de la PESI et les paramètres du QTOF.

III.3.1. Optimisation de la préparation d'échantillons

L'avantage de la PESI est la simplicité de la préparation d'échantillon qui ne nécessite qu'une simple dilution. Le choix de la dilution était donc primordial pour obtenir une réponse suffisamment intense pour être mesurée. Mais le choix du solvant l'était tout autant pour obtenir une ionisation satisfaisante des analytes à observer.

Ainsi, les tests de solvants se sont principalement portés sur un mélange éthanol/formiate d'ammonium 10 mM et un mélange isopropanol/acétate d'ammonium (expérience acquise au préalable par le laboratoire). Mais, il a été également testé l'utilisation de différents alcool (éthanol, méthanol, isopropanol), seuls, en association et en différentes proportions avec du formiate d'ammonium, de l'acétate d'ammonium ou un tampon phosphate. La comparaison de chaque solvant s'est faite à l'aide d'un échantillon « blanc » et d'un échantillon dopé à 5 ng/mL dans la salive, l'objectif étant de définir une différence significative entre un échantillon vierge de stupéfiants et un niveau bas de concentration.

En utilisant un mélange d'éthanol et de formiate d'ammonium à 10 mM, le signal obtenu était le plus intense et le plus répétable pour chacune des molécules.

III.3.2. Synchronisation PESI - QTOF

Le paramètre le plus important à optimiser au niveau de la méthode était la synchronicité entre la vitesse de l'aiguille PESI et les *Event Time* (temps de d'acquisition) du QTOF. Pour synchroniser l'ionisation à la surface de la sonde avec l'acquisition du système MS, plusieurs paramètres ont dû être ajustés, parmi lesquels : a) Le temps total de mouvement de l'aiguille (c'est-à-dire sa fréquence) ; b) Les temps d'événement du spectromètre de masse (c'est-à-dire le temps passé pour chaque événement MS1 ou MS2). Les critères de cette étude étaient la forme des pics et la surface totale des signaux obtenus dans la salive pour les différentes

molécules étudiées. Comparativement aux travaux menés en PESI-MS/MS, il a été décidé de ralentir la vitesse de l'aiguille à 400 ms (paramètre initial à 600 ms) et d'augmenter la durée des *Event Time* à 0.050 s, afin d'obtenir la meilleure « coordination » entre l'ionisation des molécules arrivant au niveau du TOF et le cycle d'acquisition de ce dernier.

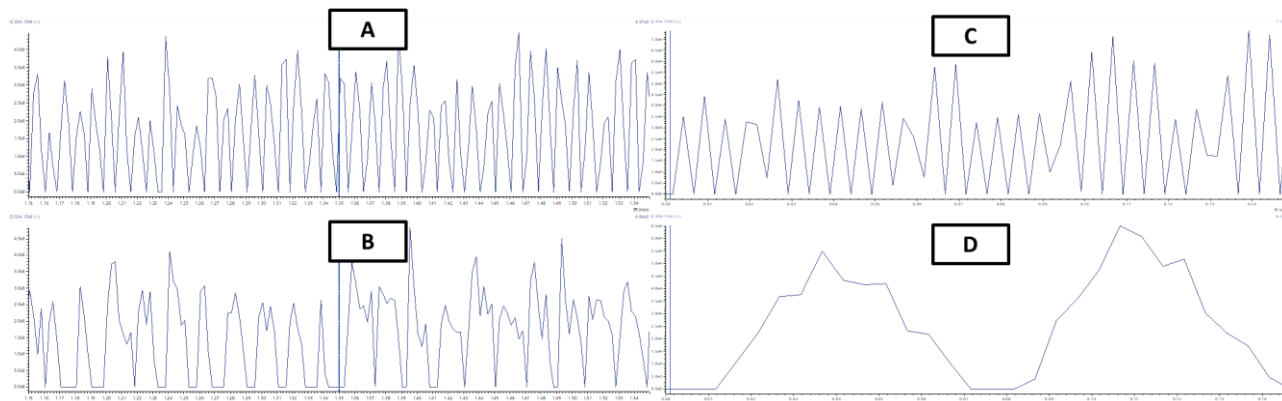


Figure 11 : Influence de la fréquence du mouvement de l'aiguille et de la durée des événements MS sur le signal, A) *Durée totale du mouvement de l'aiguille = 430 ms* ; B) *Durée totale du mouvement de l'aiguille = 1030 ms* ; C) *Temps d'acquisition MS = 50 ms* ; D) *Temps d'acquisition MS = 100 ms*

III.3.3. Plan d'expérience

Ainsi nous avons élaboré le plan d'expérience suivant, et avons pu valider les paramètres d'optimisation au fur et à mesure des expériences :

Tableau 1 : Plan des expériences réalisées

Expériences	Paramètre 1	Paramètre 2	Paramètre 3
Expérience 1	Ethanol/Formiate d'ammonium	600 ms	1,00 s Q1 +/- 4 Da
Expérience 2	IPA/acétate d'ammonium	600 ms	1,00 s Q1 +/- 4 Da
Expérience 3	Ethanol/Formiate d'ammonium	400 ms	0,050 s Q1 +/- 4 Da
Expérience 4	IPA/acétate d'ammonium	400 ms	0,050 s Q1 +/- 4 Da
Expérience 5	Ethanol/Formiate d'ammonium	400 ms	0,050 s Q1 +/- 1 Da
Expérience 6	IPA/acétate d'ammonium	400 ms	0,050 s Q1 +/- 1 Da

Il a été remarqué un bruit analytique assez important dans les échantillons « blanc » lorsque les conditions de résolution n'étaient pas assez exigeantes. Le choix a donc été de changer le paramètre de résolution du Q1 en appliquant une résolution de +/- 1 Da, et non plus de +/- 4Da pour la masse de l'ion pseudomoléculaire. Ceci nous a permis de gagner en sélectivité.

III.4. Conclusion

L'optimisation de la préparation d'échantillon a permis d'établir le protocole suivant :

Après avoir laissé sécher 24h l'échantillon FloqSwab®, l'écouvillon est imbibé de 2 mL d'éthanol/formiate d'ammonium 50/50 à 10mM puis est placé dans un bain à ultrason pendant 10min à 37°C (*Pulse* 100).

Puis dans un Eppendorf, la dilution de l'échantillon se fait en suivant le protocole suivant :

- 50 µL de matrice (salive)
- Dilués dans 500 µL d'un mélange éthanol/formiate d'ammonium à 10mM (50/50 v/v)
- Ajout de 10 µL de la solution contenant les étalons internes.

Pour vérifier la linéarité de la méthode mis en place, des gammes d'étalonnage ont été réalisées en matrice salivaire. Pour ce faire, de la salive vierge a été récoltée auprès de volontaires et placés au réfrigérateur pendant 24h avant analyse. La salive a ensuite été dopée avec une solution de CAO aux concentrations suivantes : 5, 10, 25, 50 et 100 ng/mL. Les gammes étaient préparées selon le protocole cité ci-dessus.

Après optimisation, le choix de la méthode d'analyse finale portait sur un mode d'acquisition dit « MS/MS » ou MS2, en mode d'ionisation positif. Brièvement, le mode d'acquisition « MS/MS » est basé sur la recherche de la fragmentation d'une masse x d'un composé. Pour se faire, en Q1, la sélection de tous les composés ayant une masse x à +/-1 Da sont considérés pour être fragmentés par la cellule de collision. Dans cette cellule, les composés sont soumis à une rampe d'énergie de collision allant de 5 à 55 V. Ainsi, les composés qui parviennent au TOF sont identifiés en fonction de leur masse exacte et de l'ensemble de leurs fragments. L'avantage d'un mode d'acquisition « MS/MS » par rapport à un mode classique de « MRM » (« multiple reaction monitoring »), tient donc à l'exhaustivité de l'information spectrale : on dispose de l'ensemble de l'information des fragments obtenu en MS2 quand un mode MRM se limite à l'information des transitions sélectionnés en amont.

Les critères d'identification suivants ont été appliqués pour chaque molécules : 2 ions dont l'ion précurseur et un de ses fragments avec (pour les deux) une précision de masse ≤ 5 ppm (ou < 1 mDa pour $m/z < 200$) pour prouver la présence de la molécule.

Ce procédé d'acquisition permet d'obtenir une réponse plus intense en MS1 pour l'ion pseudomoléculaire d'intérêt et de pouvoir choisir les fragments qui semblent les plus pertinents.

Les conditions analytiques optimisées sont présentées ci-après et dans le tableau 3 :

- Tension appliquée à l'aiguille : 2,3 kV

- Temps de cycle de l'aiguille : 400 ms
- Température de la « desolvatation line » : 250°C
- Température du « heat block » : 50°C
- Durée de chaque acquisition par le TOF : 0,050 s

Tableau 2 : Paramètres analytiques définis pour les molécules de CAO

Molécules CAO	Ions précurseurs et ions fragments (m/z)	Energie de collisions (V)	Molécules étalon interne	Ions précurseurs et ions fragments (m/z)	Energie de collisions (V)
6-MAM	328.1543>165.0699	43	6-MAM-D3	331.1734>165.0699	43
Amphétamine	136.1110>91.0542	19	Amphétamine-D5	141.1429>93.0660	18
Benzoylécgonine	290.1382>168.1019	18	Benzoylécgonine-D3	293.1576>171.1207	19
Cocaïne	304.1543>182.1176	20	Cocaïne-D3	307.1734>185.1364	19
EME	200.1281>182.1176	16	EME-D3	203.1467>185.1362	24
MDA	180.1019>105.0699	22	MDA-D5	185.1331>168.1063	13
MDEA	208.1332163.0754	15	MDEA-D5	213.1644>163.0751	14
MDMA	194.1171>163.0754	24	MDMA-D5	199.1487>165.0877	15
Méthamphétamine	150.1277>91.0542	23	Méthamphétamine-D5	155.1585>92.0599	20

IV. Validation de la méthode

L'étape de la validation d'une méthode intervient une fois l'optimisation terminée. Il s'agit de la procédure par laquelle on démontre, preuves expérimentales à l'appui, que les performances de la méthode permettent de répondre aux exigences de l'usage auquel elle est destinée. Elle apporte la preuve aux autorités en charge de son évaluation que son usage rend des résultats les plus proches possible de la réalité.

La validation a été menée selon la procédure interne au laboratoire, validée par le comité français d'accréditation (COFRAC). Le laboratoire travaille sous accréditation COFRAC selon la norme ISO 15189 (numéro d'accréditation 8-2607).

L'arrêté du 13 décembre 2016 énonce que les méthodes analytiques doivent présenter une limite de détection d'au moins 10 ng/mL. Dans la méthode développée, nous avons toutefois inséré un point de gamme à 5 ng/mL.

La validation de la méthode analytique préalablement optimisée s'est déroulée en vérifiant la validité des critères suivants :

- La linéarité
- La limite de détection et de quantification
- La répétabilité
- La reproductibilité
- L'exactitude

IV.1.1. Linéarité : création d'une gamme dynamique

Pour vérifier la linéarité, des gammes d'étalonnage ont été réalisées en matrice salivaire. La gamme a été préparée selon le protocole décrit précédemment.

L'analyse de la linéarité de la méthode s'est déroulée sur six jours, avec deux gammes différentes réalisées chaque jour.

Ce paramètre permet de justifier que notre méthode présente une réponse d'intensité proportionnelle à la concentration théorique dans un échantillon. Elle est estimée par un coefficient de détermination r^2 qui se doit d'être le plus proche de 1.

IV.1.2. Détermination des limites de détection et des limites de quantification

Des écouvillons de type FloqSwab® ont été prélevés chez 30 volontaires ayant une salive exempte de stupéfiants, répartis sur trois jours et analysés selon le plan suivant :

- J1 : Analyses de 10 échantillons de volontaires vierge de molécules CAO
- J2 : Analyses de 10 nouveaux échantillons de volontaires vierge de molécules CAO ainsi que des 10 échantillons du J1.
- J3 : Analyses de 10 nouveaux échantillons de volontaires vierge de molécules CAO ainsi que des 10 échantillons du J1 et du J2.

- J4 : Analyses de 10 échantillons de volontaires vierge de molécules CAO du J2 et du J3.
- J5 : Analyses des 10 échantillons de volontaires vierge de molécules CAO du J3.

La limite de détection (LDD) et la limite de quantification (LDQ) sont calculées ensuite en multipliant les écart-types des concentrations mesurées dans les blancs, respectivement par 3 et par 10. On parle ici de limites instrumentales.

Cette mesure nous permet de nous confronter aux exigences de la loi en terme de LDD (10 ng/mL). Cette mesure nous permet également de déterminer la sensibilité de notre méthode (rendre un résultat positif en présence d'un des stupéfiants) et sa spécificité (rendre un résultat négatif quand celui-ci ne présente pas de stupéfiants).

IV.1.3. Répétabilité et reproductibilité

La répétabilité a été évaluée de la manière suivante :

Six échantillons ont été analysés le même jour, à 3 niveaux de concentrations : 5, 25 et 100 ng/mL. Selon les critères du laboratoire, la répétabilité est jugée conforme si le coefficient de variation (CV) et le biais sont inférieurs à 15% pour les concentrations hautes et intermédiaires, et inférieurs à 20% pour la concentration basse.

La reproductibilité a été évaluée de la manière suivante :

Trois niveaux de concentrations ont été analysés sur 6 jours consécutifs : 5, 25 et 100 ng/mL. Selon les critères du laboratoire, la reproductibilité est jugée conforme si le coefficient de variation (CV) et le biais sont inférieurs à 15% pour les concentrations hautes et intermédiaires, et inférieurs à 20% pour la concentration basse.

Les échantillons ont été préparés selon le protocole de préparation d'échantillon décrit précédemment à partir d'écouvillons salivaires récoltés auprès de volontaires « négatifs » à la recherche de stupéfiants dans la salive.

Ces mesures expriment l'étroitesse de l'accord entre les résultats obtenus sous des conditions précises sur une durée déterminée. L'écart-type mesuré renseigne sur la fidélité, plus il est faible et plus la fidélité est grande

IV.1.4. Exactitude : comparaison à une méthode de routine

Des échantillons transmis au laboratoire pour analyse ont été analysés à l'aide de la méthode PESI-QTOF développée et d'une méthode LC-MS/MS utilisée en routine dans le laboratoire (voir plus haut).

Les échantillons étaient tous des FloqSwabs® séchés auxquels la préparation d'échantillon mentionnée précédemment a été appliquée.

Nous avons fait le choix de présenter ici les résultats obtenus pour 83 échantillons transmis au laboratoire pour une recherche/dosage des dérivés de la cocaïne.

V. Résultats

V.1.1. Linéarité

La figure 6 ci-dessous est un exemple de résultat obtenu pour une salive surchargée à 50 ng/mL de cocaïne.

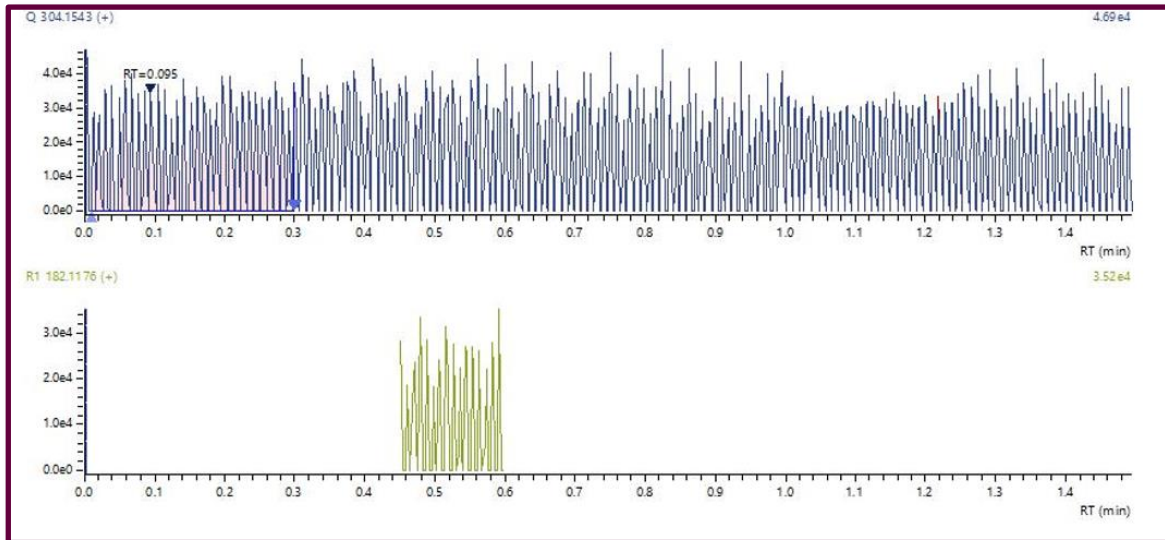


Figure 6 : Signal MS1 et MS2 pour la cocaïne à 50 ng/mL

Dans la partie haute (signal en bleu), on observe la détection de l'ion pseudomoléculaire ($M+H^+$) de la cocaïne (masse de 304.1543) et dans la partie basse (signal en vert), sa transition de confirmation d'une masse de 182.1176.

La figure 7 représente les résultats obtenus pour la BZE (métabolite spécifique de la cocaïne) pour un point blanc et le point le plus bas de la gamme à 5 ng/mL.

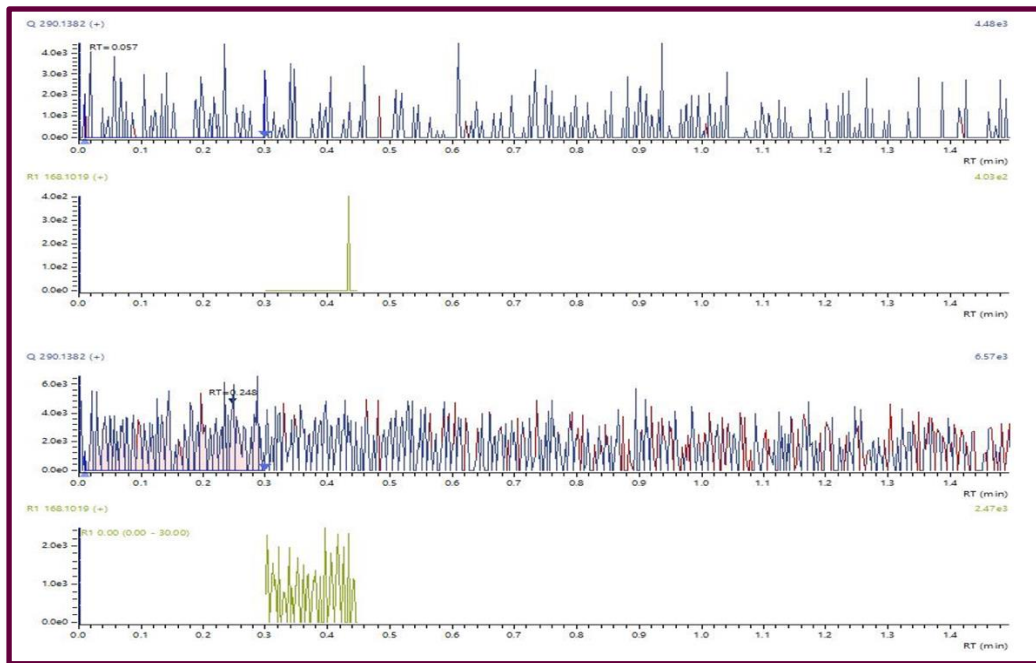


Figure 7 : Signal obtenu en MS1 et MS2 pour la BZE dans un point « blanc » (en haut) et au point à 5 ng/mL (en bas)

Les résultats pour la linéarité étaient très satisfaisants. Les courbes étaient tracées en mode quadratique car il existe une saturation lorsque l'on s'approche de valeur haute (100 ng/mL). Les valeurs des coefficients de détermination (r^2) obtenus pour chacune des molécules étaient d'environ 0,999.

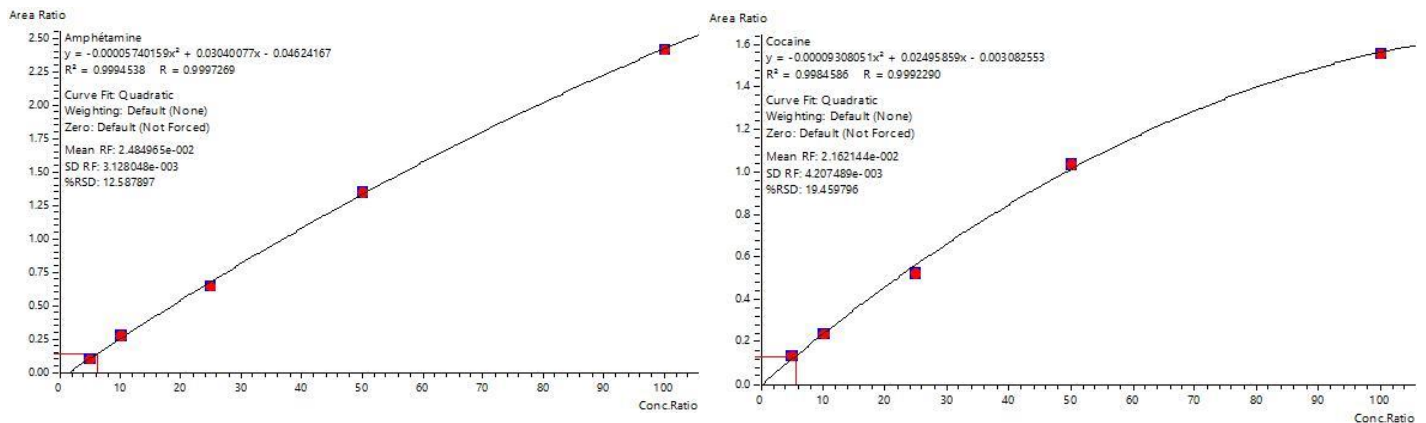


Figure 8 : Exemple des droites de calibration obtenues avec la méthode pour l'amphétamine (à gauche) et la cocaïne (à droite)

V.1.2. Limite de détection et de quantification

Les valeurs de LDD et LDQ mesurées dans les blancs de salive sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau 3 : Détermination de la LDD et de la LDQ pour chaque molécules de la méthode

Molécules recherchés	LDD (ng/mL)	LDQ (ng/mL)
6-MAM	2,25	7,25
Amphétamine	9,75	32,50
Benzoylécgonine	2,25	7,50
Cocaïne	1,00	2,75
EME	3,00	10,00
MDA	1,50	4,75
MDEA	1,50	5,00
MDMA	2,00	6,75
Méthamphétamine	0,75	2,00

La LDD et de la LDQ de chaque molécule a été calculée puis a été rapportée à 0,25 ng/mL par excès près.

Pour chacune des molécules la valeur maximale de LDD autorisée par l'arrêté du 13 décembre 2016 était respectée (< 10 ng/mL).

V.1.3. Reproductibilité et répétabilité

Les valeurs de reproductibilité sont présentées dans le tableau suivant :

Tableau 4 : Résultats de reproductibilité

Molécules recherchés	5 ng/mL		25 ng/mL		100 ng/mL	
	CV (%)	Biais (%)	CV (%)	Biais (%)	CV (%)	Biais (%)
6-MAM	10,49	17,69	7,18	3,77	0,20	0,16
Amphétamine	6,42	11,37	7,03	11,80	0,16	0,32
Benzoylécgonine	15,25	1,97	9,14	4,95	0,16	0,14
Cocaïne	10,05	8,04	7,89	7,56	0,23	0,18
EME	11,79	2,56	5,41	3,30	0,09	0,05
MDA	8,23	18,05	6,81	8,17	0,05	0,11
MDEA	14,89	11,14	5,69	10,24	0,15	0,22
MDMA	8,89	6,56	4,54	6,08	0,11	0,13
Méthamphétamine	15,42	14,99	10,44	6,49	0,25	0,08

Les valeurs de répétabilité sont présentées dans le tableau suivant :

Tableau 5 : Résultats de répétabilité

Molécules recherchés	5 ng/mL		25 ng/mL		100 ng/mL	
	CV (%)	Biais (%)	CV (%)	Biais (%)	CV (%)	Biais (%)
6-MAM	12,11	3,78	14,39	1,20	3,13	0,16
Amphétamine	18,81	17,47	13,86	0,60	6,24	0,28
Benzoylécgonine	15,84	5,31	14,97	1,02	2,41	0,22
Cocaïne	10,54	5,13	5,91	0,94	10,66	0,17
EME	19,89	5,63	7,71	1,06	4,82	0,23
MDA	17,07	6,53	16,53	0,93	9,65	0,25
MDEA	14,77	5,72	7,81	0,88	4,30	0,23
MDMA	10,91	7,57	8,46	0,64	8,12	0,27
Méthamphétamine	19,02	12,36	16,92	0,21	3,23	3,23

Pour toutes les molécules les valeurs de CV et de biais satisfaisaient aux exigences. Deux valeurs de CV étaient au-dessus des recommandations, il s'agissait de la MDA et de la méthamphétamine à concentration intermédiaire de 25 ng/mL.

V.1.4. Comparaison en LC-MS/MS

Les échantillons reçus en routine dans les cas où au moins un stupéfiant a été détecté par la méthode de référence, ont ensuite été analysés avec la méthode PESI-HRMS. Les résultats obtenus n'ont pas été quantifiés mais rendus sous la forme de résultats qualitatifs « positif »/ « négatif ».

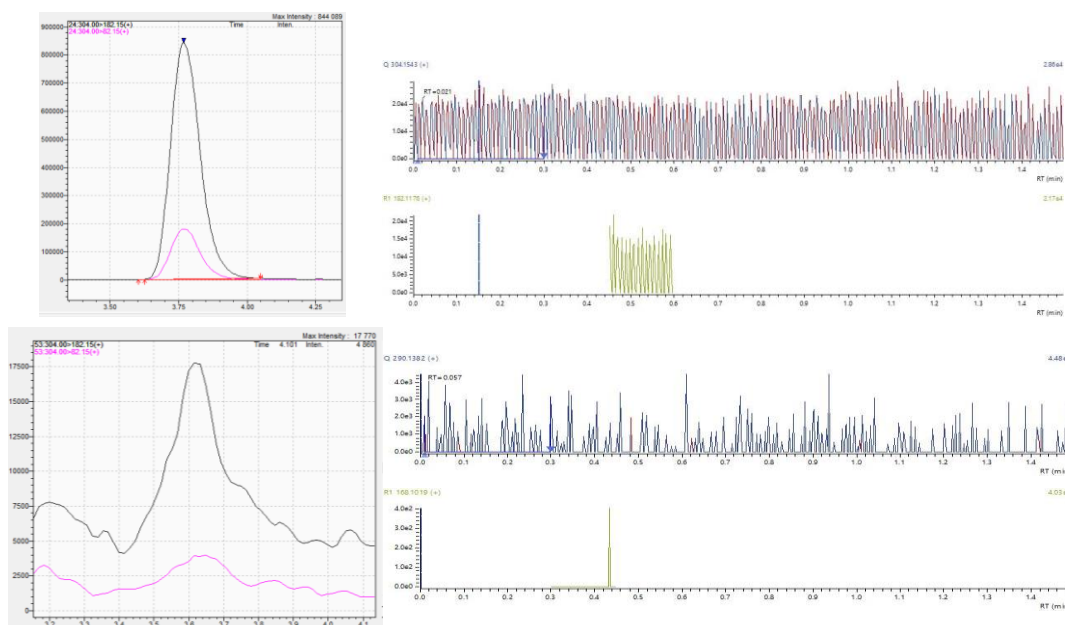


Figure 12 : Comparaison d'un patient positif à la cocaïne (en haut) et négatif à la cocaïne (en bas) en LC-MS/MS (à gauche) et en PESI-QT (à droite)

Pour les 83 dossiers dédiés à la recherche des cocaïniques, l'analyse par méthode LC-MS/MS a détecté 61.6% de positifs à la cocaïne, 98.5% à la BZE et 97.2% à l'EME. Nous avons obtenus une parfaite concordance entre les résultats observés avec la méthode PESI-QTOF et la méthode de référence pour la cocaïne et ses dérivés, peu importe que le cas soit positif ou négatif.

VI. Discussion

Nous avons optimisé une méthode de PESI-HRMS permettant la recherche dans la salive, en moins de 2 minutes, après une préparation simple des échantillons, de différentes substances classées comme stupéfiants, à un seuil de détection répondant aux exigences de la législation en vigueur concernant la conduite automobile après usage de stupéfiants. Ces travaux présente le premier couplage entre une source PESI et un système HRMS. La méthode développée et optimisée a pu être validé au terme de ces travaux pour 9 molécules classées comme stupéfiants.

Usuellement, les méthodes analytiques dédiées à la recherche et au dosage des produits stupéfiants dans la salive se font par LC-MS/MS³¹⁻³⁵. Le laboratoire de l'UF de toxicologie biologique et médico-légale du CHU de Limoges a développé une méthode publiée sur un système LC-MS/MS de type triple quadripôle, modèle 8050 de la société Shimadzu^{®27}. C'est cette méthode qui est utilisée en routine pour les analyses demandées dans un contexte de toxicologie clinique ou un contexte médico-légal. Pour cette méthode, la préparation des échantillons salivaire repose sur une méthode d'extraction par sels QuECHERS. Ce type de protocoles de préparation d'échantillon comportent plusieurs étapes avec ajout de solvants, centrifugation, transfert d'un contenant à un autre. Même s'ils ont déjà permis de simplifier significativement la préparation des échantillons qui a longtemps reposé sur des extractions liquide-liquide, ils ne permettent pas un rendu de résultat en moins d'une heure²⁷. Ce délai de rendu de résultat joue en défaveur de la spectrométrie de masse vis-à-vis des analyses d'immunochimie qui permettent usuellement d'obtenir un résultat en 10 à 15 minutes. De nombreux laboratoires font donc toujours appel à cette approche même si elle ne permet pour les stupéfiants que d'obtenir un résultat qualitatif.

Des travaux rapportant un couplage entre une source PESI et un spectromètre de masse de basse résolution ont déjà été menés au CHU de Limoges. Ils ont permis de mettre au point des méthodes de « ultra rapides »^{25,36}. En amont des travaux menés dans cette thèse, il avait été montré qu'il était possible de rechercher les stupéfiants dans la salive par un même couplage (Travaux de Master de Pauline Griffueille). Ces derniers mettaient encore en avant les avantages de l'approche : pas ou peu de préparation de l'échantillon, et pas de temps de séparation chromatographique. Par contre, ils avaient soulevé la problématique de nombreuses interférences impossibles à lever.

Par rapport à cette première approche, l'utilisation de la HRMS a permis, grâce au suivi de la masse exacte, de diminuer très sensiblement ces problèmes d'interférence par différenciation de composés isobariques co-élués. Notamment, l'amphétamine qui n'avait pas pu être intégrée à la méthode de PESI-MS/MS a pu l'être ici par le couplage au QTOF. Théoriquement, ce problème de manque (relatif) de spécificité, pour l'amphétamine par exemple, peut être résolu par l'utilisation de la HRMS. Néanmoins, des critères d'identification doivent également être respectés avec cette approche (par exemple, différence entre les masses exactes et mesurées de l'ion précurseur et d'un fragment doit être inférieur ou égale à 5 ppm).³⁷ C'est pour cette raison que nous avons inclus deux étapes de calibration à notre méthode avant et après chaque série d'échantillons.

Comme il s'agissait de premier travaux concernant le couplage entre la PESI et l'HRMS, de nombreux paramètres d'optimisation ont été nécessaires et notamment, un important travail a été réalisé pour synchroniser la vitesse de l'aiguille PESI et pour déterminer les modes d'acquisition du QTOF permettant d'obtenir la meilleure sensibilité. Les meilleurs signaux ont

été obtenues pour les 9 composés et leurs étalons internes en réduisant la vitesse de l'aiguille à une fréquence de 2.3 Hz et un temps d'acquisition de 0.05 secondes en « MS » et « MS/MS ». La méthode d'analyse choisie dans ses travaux a été une approche dite ciblée (mode « MS/MS ») dans laquelle les fragments spécifiques (« ion de confirmation ») sont analysés à tour de rôle pendant les 1,5 min d'acquisition. Cette acquisition « MS/MS » suit une acquisition « MS » (full-scan) qui se déroule, elle, sur la durée totale de la méthode. Cette combinaison originale nous a permis d'obtenir les ions précurseurs des molécules recherchées avec une intensité maximale, tout en conservant la meilleure spécificité possible grâce aux ions de confirmation. Ce mode d'acquisition a été préféré à un mode MRM classique qui donnait une sensibilité et une spécificité avec une moins bonne qualité pour le couplage PESI-HRMS.

Nous avons introduit dans la méthode un étalon interne deutéré par molécule. La méthode d'acquisition est dessinée afin que ce dernier soit recherché en même temps que la molécule non deutérée dont il dérive. Cette approche permet de lever le poids de l'effet matrice qui est important avec la salive.

La source PESI a déjà démontré son avantage certain dans le cadre de différentes applications en recherche. Au sein même de l'UF de toxicologie biologique et médico-légale du CHU de Limoges, une méthode a été développée sur PESI-MS/MS dans le cadre du diagnostic d'acidose lactique qui peut être induite ou associée à des concentrations plasmatiques élevées de Metformine (un médicament prescrit chez la majorité des patients diabétique). Les travaux réalisés ont permis de développer une méthode spécifique, sensible, précise et ultrarapide dans le plasma avec une durée totale d'analyse de 0,31 minutes permettant un diagnostic rapide d'acide lactique au laboratoire quand celui-ci se révèle nécessaire.²⁵ Des travaux ont également été réalisés pour la recherche et le dosage des benzodiazépines (BZD, famille de molécules légalement prescrites mais victime bien souvent de mésusage) dans le sérum. Au terme de ces travaux, une méthode de détection et de quantification de 18 molécules (commerciales ou illicites) par une approche ciblée (mode « MRM ») en moins de 2,5 minutes a été publiée³⁶.

En l'état, la méthode que nous avons développée n'inclut ni la morphine, ni le THC (principe actif du cannabis) qui font partie des molécules devant être recherchées selon législation. Nous sommes parvenus à obtenir une LDD de 10 ng/mL pour la morphine, mais les résultats de preuves de reproductibilité et répétabilité ne satisfaisaient pas aux exigences de la norme ISO 15189.

Par ailleurs, la plupart des travaux ayant pour objectif le dosage des stupéfiants dans la salive par LC-MS/MS, selon les exigences de la loi, ont dû mettre au point deux méthodes d'extraction différentes pour analyser à la fois les CAO et le THC, mettant en évidence la difficulté de développer une méthode unique pour l'analyse de l'ensemble de stupéfiants simultanément. En parallèle de la méthode analytique présentée dans ce mémoire, nous avons débuté le développement d'une méthode pour la recherche du THC dans la salive par PESI-HRMS. Nous sommes parvenus à optimiser les conditions analytiques permettant la détection du THC au seuil de 1 ng/mL et le prochain objectif est d'insérer cette molécule à la méthode présentée dans ce manuscrit.

Bien que les systèmes LRMS soient considérés comme plus sensibles que les systèmes HRMS, au cours des dernières années, la HRMS a bénéficié d'améliorations techniques en termes de sensibilité.^{38,39} Dans ces travaux, le couplage PESI-HRMS a permis d'obtenir des valeurs de LDD très satisfaisantes bien en deçà de ce qui est recommandé par la loi et, pour

la cocaïne par exemple, inférieur à ce qui est obtenu en routine (1ng/ml contre 3 ng/mL en routine).

Ces travaux ont également contribué à l'écriture d'une publication concernant exclusivement la détection de la cocaïne et ses dérivés en 45 secondes. Dans ces travaux, afin d'argumenter encore plus l'intérêt et la faisabilité du couplage, une validation complète de la méthode a été réalisée en ajoutant des épreuves de *Carry-over*, de spécificité et d'effet matrice. Cette publication est toujours en cours d'écriture à l'heure actuelle et l'abstract de celle-ci est présenté en annexe 3.

Conclusion et perspectives

Les travaux réalisés dans le cadre de cette thèse démontrent la possibilité et l'efficacité d'un couplage PESI-HRMS de type QTOF pour la recherche et le dosage de produits stupéfiants dans la salive. Cette approche permet une analyse ultrarapide, inférieure à 2 min, sans séparation chromatographique et avec une préparation d'échantillon minime. Grâce à la spectrométrie de masse de résolution, ce couplage a amélioré la spécificité et a diminué encore le risque de faux positifs par rapport à un couplage PESI-MS/MS.

La méthode ainsi développée a permis l'analyse simultanée de 9 molécules appartenant aux classes de produits stupéfiants qui doivent être recherchés dans la salive chez les conducteurs de véhicules. Chacune d'entre elles ont pu être détectée à un seuil inférieur à 10 ng/mL, tel qu'exigé par la législation. Cependant, nous n'avons pas pu intégrer la morphine car nos données de validation ne satisfaisaient pas aux exigences de la norme ISO 15189 appliquée au laboratoire. D'autre part, il sera également intéressant d'inclure la recherche de THC pour que la méthode puisse être transférée vers une application en routine.

Au terme de ces travaux, une publication sur l'optimisation et la validation d'une méthode de dosage de cocaïne et dérivés dans la salive sur un système PESI-QTOF est en cours de publication. Bien que limité à la seule recherche de cocaïne et de ses dérivés, les travaux réalisés dans le cadre de ses travaux de thèse et de la publication, démontrent bien l'efficacité et la rapidité d'analyse par la sélectivité de la source PESI et par la sensibilité d'un QTOF.

Références bibliographiques

- (1) Rius, C.; Saint-Marcoux, F. Expérimentation du cannabis médical : une impasse pour la réglementation sur la conduite automobile ? *Toxicol. Anal. Clin.* **2023**, *35* (2), 143–150. <https://doi.org/10.1016/j.toxac.2022.11.006>.
- (2) Qu'est-Ce Qu'une Drogue ? <https://www.drogues.gouv.fr/quest-ce-quune-drogue> (accessed 2023-05-21).
- (3) SFTA. *Consensus Stupéfiants*; 2015.
- (4) Kelly, E.; Darke, S.; Ross, J. A Review of Drug Use and Driving: Epidemiology, Impairment, Risk Factors and Risk Perceptions. *Drug Alcohol Rev.* **2004**, *23* (3), 319–344. <https://doi.org/10.1080/09595230412331289482>.
- (5) Stupefiants Au Volant : Chiffres et Risques. **2023**.
- (6) Académie nationale de médecine. Données Épidémiologiques Récentes Sur Les Drogues Illicites En France : Prévalence et Conséquences Sanitaires Des Consommations, Disponibilité et Qualité Des Produits.
- (7) Bluth, M. H.; Pincus, M. R. Narcotic Analgesics and Common Drugs of Abuse. *Clin. Lab. Med.* **2016**, *36* (4), 603–634. <https://doi.org/10.1016/j.cll.2016.07.013>.
- (8) Mura, P.; Kintz, P. *Drogues et accidentalité*; EDP Sciences: Les Ulis, France, 2011.
- (9) Tamama, K. Advances in Drugs of Abuse Testing. *Clin. Chim. Acta* **2021**, *514*, 40–47. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2020.12.010>.
- (10) Cocaine. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/cocaine> (accessed 2023-11-28).
- (11) Roque Bravo, R.; Faria, A. C.; Brito-da-Costa, A. M.; Carmo, H.; Mladěnka, P.; Dias Da Silva, D.; Remião, F.; on behalf of The OEMONOM Researchers. Cocaine: An Updated Overview on Chemistry, Detection, Biokinetics, and Pharmacotoxicological Aspects Including Abuse Pattern. *Toxins* **2022**, *14* (4), 278. <https://doi.org/10.3390/toxins14040278>.
- (12) Prakash, A.; Das, G. Cocaine and the Nervous System. *Int. J. Clin. Pharmacol.* **1993**, *31* (12), 575–581.
- (13) Amphetamine. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3007> (accessed 2023-11-28).
- (14) Heal, D. J.; Smith, S. L.; Gosden, J.; Nutt, D. J. Amphetamine, Past and Present – a Pharmacological and Clinical Perspective. *J. Psychopharmacol. (Oxf.)* **2013**, *27* (6), 479–496. <https://doi.org/10.1177/0269881113482532>.
- (15) Sverrisdóttir, E.; Lund, T. M.; Olesen, A. E.; Drewes, A. M.; Christrup, L. L.; Kreilgaard, M. A Review of Morphine and Morphine-6-Glucuronide's Pharmacokinetic–Pharmacodynamic Relationships in Experimental and Clinical Pain. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2015**, *74*, 45–62. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2015.03.020>.
- (16) Heroin. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/heroin> (accessed 2023-12-12).
- (17) Lugo, R. A.; Kern, S. E. Clinical Pharmacokinetics of Morphine. *J. Pain Palliat. Care Pharmacother.* **2002**, *16* (4), 5–18. https://doi.org/10.1080/J354v16n04_02.
- (18) Demaret, I.; Lemaître, A.; Anseau, M. [Heroin]. *Rev. Med. Liege* **2013**, *68* (5–6), 287–293.

- (19) Scheidweiler, K. B.; Kolbrich Spargo, E. A.; Kelly, T. L.; Cone, E. J.; Barnes, A. J.; Huestis, M. A. Pharmacokinetics of Cocaine and Metabolites in Human Oral Fluid and Correlation With Plasma Concentrations After Controlled Administration. *Ther. Drug Monit.* **2010**, *32* (5), 628–637. <https://doi.org/10.1097/FTD.0b013e3181f2b729>.
- (20) Hiraoka, K.; Nishidate, K.; Mori, K.; Asakawa, D.; Suzuki, S. Development of Probe Electrospray Using a Solid Needle. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2007**, *21* (18), 3139–3144. <https://doi.org/10.1002/rcm.3201>.
- (21) Griffeuille, P.; El Balkhi, S.; Bodeau, S.; Lamoureux, F.; Marquet, P.; Dulaurent, S.; Saint-Marcoux, F. Ultrafast Measurement of Metformin in the Clinical Setting Using Probe Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *J. Anal. Toxicol.* **2023**, *47* (1), 89–95. <https://doi.org/10.1093/jat/bkac034>.
- (22) Hiraoka, K.; Ariyada, O.; Usmanov, D. T.; Chen, L. C.; Ninomiya, S.; Yoshimura, K.; Takeda, S.; Yu, Z.; Mandal, M. K.; Wada, H.; Rankin-Turner, S.; Nonami, H. Probe Electrospray Ionization (PESI) and Its Modified Versions: Dipping PESI (dPESI), Sheath-Flow PESI (sfPESI) and Adjustable sfPESI (Ad-sfPESI). *Mass Spectrom.* **2020**, *9* (1), A0092–A0092. <https://doi.org/10.5702/massspectrometry.A0092>.
- (23) Rouessac, F.; Rouessac, A.; Cruché, D.; Martel, A. *Analyse chimique: méthodes et techniques instrumentales*, 9e éd.; Sciences sup; Dunod: Malakoff, 2019.
- (24) Zarrouk, E.; Lenski, M.; Bruno, C.; Thibert, V.; Contreras, P.; Privat, K.; Ameline, A.; Fabresse, N. High-Resolution Mass Spectrometry: Theoretical and Technological Aspects. *Toxicol. Anal. Clin.* **2022**, *34* (1), 3–18. <https://doi.org/10.1016/j.toxac.2021.11.002>.
- (25) Griffeuille, P.; El Balkhi, S.; Bodeau, S.; Lamoureux, F.; Marquet, P.; Dulaurent, S.; Saint-Marcoux, F. Ultrafast Measurement of Metformin in the Clinical Setting Using Probe Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *J. Anal. Toxicol.* **2023**, *47* (1), 89–95. <https://doi.org/10.1093/jat/bkac034>.
- (26) Usui, K.; Minami, E.; Fujita, Y.; Kubota, E.; Kobayashi, H.; Hanazawa, T.; Yoshizawa, T.; Kamijo, Y.; Funayama, M. Application of Probe Electrospray Ionization-Tandem Mass Spectrometry to Ultra-Rapid Determination of Glufosinate and Glyphosate in Human Serum. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2019**, *174*, 175–181. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2019.05.040>.
- (27) Dulaurent, S.; El Balkhi, S.; Poncelet, L.; Gaulier, J.-M.; Marquet, P.; Saint-Marcoux, F. QuEChERS Sample Preparation Prior to LC-MS/MS Determination of Opiates, Amphetamines, and Cocaine Metabolites in Whole Blood. *Anal. Bioanal. Chem.* **2016**, *408* (5), 1467–1474. <https://doi.org/10.1007/s00216-015-9248-3>.
- (28) Fabresse, N.; Aouad, H.; Knapp, A.; Mayer, C.; Etting, I.; Larabi, I. A.; Alvarez, J. Development and Validation of a Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry Method for Simultaneous Detection of 10 Illicit Drugs in Oral Fluid Collected with FLOQSwabs™ and Application to Real Samples. *Drug Test. Anal.* **2019**, *11* (6), 824–832. <https://doi.org/10.1002/dta.2563>.
- (29) Coorevits, L.; Vanscheeuwijck, C.; Traen, A.; Bingé, L.; Ryckaert, I.; Padalko, E. Evaluation of Copan FLOQSwab for the Molecular Detection of *Chlamydia Trachomatis* by Abbott RealTime CT PCR. *Acta Clin. Belg.* **2015**, *70* (6), 398–402. <https://doi.org/10.1179/2295333715Y.0000000036>.

- (30) Ambers, A.; Wiley, R.; Novroski, N.; Budowle, B. Direct PCR Amplification of DNA from Human Bloodstains, Saliva, and Touch Samples Collected with microFLOQ® Swabs. *Forensic Sci. Int. Genet.* **2018**, *32*, 80–87. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2017.10.010>.
- (31) Kneisel, S.; Auwärter, V.; Kempf, J. Analysis of 30 Synthetic Cannabinoids in Oral Fluid Using Liquid Chromatography-electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. *Drug Test. Anal.* **2013**, *5* (8), 657–669. <https://doi.org/10.1002/dta.1429>.
- (32) Strano-Rossi, S.; Anzillotti, L.; Castrignanò, E.; Romolo, F. S.; Chiarotti, M. Ultra High Performance Liquid Chromatography–Electrospray Ionization–Tandem Mass Spectrometry Screening Method for Direct Analysis of Designer Drugs, “Spice” and Stimulants in Oral Fluid. *J. Chromatogr. A* **2012**, *1258*, 37–42. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.07.098>.
- (33) Wagner, E.; Raabe, F.; Martin, G.; Winter, C.; Plörer, D.; Krause, D. L.; Adorjan, K.; Koller, G.; Pogarell, O. Concomitant Drug Abuse of Opioid Dependent Patients in Maintenance Treatment Detected with a Multi-target Screening of Oral Fluid. *Am. J. Addict.* **2018**, *27* (5), 407–412. <https://doi.org/10.1111/ajad.12737>.
- (34) Huestis, M. A. A New Ultraperformance–Tandem Mass Spectrometry Oral Fluid Assay for 29 Illicit Drugs and Medications. *Clin. Chem.* **2009**, *55* (12), 2079–2081. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2009.134551>.
- (35) Lee, P. D.; Chang, Y.-J.; Lin, K.-L.; Chang, Y.-Z. Simultaneous Determination of Δ^9 -Tetrahydrocannabinol and 11-nor-9-Carboxy- Δ^9 -Tetrahydrocannabinol in Oral Fluid Using Isotope Dilution Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* **2012**, *402* (2), 851–859. <https://doi.org/10.1007/s00216-011-5439-8>.
- (36) Griffeuille, P.; El Balkhi, S.; Dulaurent, S.; Saint-Marcoux, F. Probe Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry for the Detection and Quantification of Benzodiazepines. *Ther. Drug Monit.* **2024**. <https://doi.org/10.1097/FTD.0000000000001189>.
- (37) Helfer, A. G.; Michely, J. A.; Weber, A. A.; Meyer, M. R.; Maurer, H. H. LC-HR-MS/MS Standard Urine Screening Approach: Pros and Cons of Automated on-Line Extraction by Turbulent Flow Chromatography versus Dilute-and-Shoot and Comparison with Established Urine Precipitation. *J. Chromatogr. B* **2017**, *1043*, 138–149. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.06.036>.
- (38) Wille, S. M. R.; Desharnais, B.; Pichini, S.; Trana, A. D.; Busardò, F. P.; Wissenbach, D. K.; Peters, F. T. Liquid Chromatography High-Resolution Mass Spectrometry in Forensic Toxicology: What Are the Specifics of Method Development, Validation and Quality Assurance for Comprehensive Screening Approaches? *Curr. Pharm. Des.* **2022**, *28* (15), 1230–1244. <https://doi.org/10.2174/1381612828666220526152259>.
- (39) Maurer, H. H. Hyphenated High-Resolution Mass Spectrometry—the “All-in-One” Device in Analytical Toxicology? *Anal. Bioanal. Chem.* **2021**, *413* (9), 2303–2309. <https://doi.org/10.1007/s00216-020-03064-y>.

Annexes

Annexe 1. Liste des substances classées comme stupéfiants selon l'arrêté du 22 février 1990



RÉPUBLIQUE
FRANÇAISE

Liberté
Égalité
Fraternité

Légifrance

Le service public de la diffusion du droit

Arrêté du 22 février 1990 fixant la liste des substances classées comme stupéfiants

Article Annexe I

Version en vigueur depuis le 17 octobre 2019

Annexe I

Version en vigueur depuis le 17 octobre 2019

Modifié par Arrêté du 14 octobre 2019 - art. 1

Cette annexe comprend :

- les substances ci-après désignées ;
- leurs isomères, sauf exception expresse, dans tous les cas où ils peuvent exister, conformément à la formule chimique correspondante desdites substances ;
- les esters et éthers desdites substances ou isomères à moins qu'ils ne soient inscrits à une autre annexe, dans tous les cas où ils peuvent exister ;
- les sels desdites substances, de leurs isomères, de leurs esters et éthers dans tous les cas où ils peuvent exister ;
- les préparations renfermant les produits ci-dessus mentionnés à l'exception de celles nommément désignées ci-dessous ;

Acétorphine
Acétylalphaméthylfentanyl
acétylfentanyl et MT-45 ou 1-cyclohexyl-4-(1,2-diphényléthyl) pipérazine

Acétylméthadol

"AH-7921" ou "3,4-dichloro-N-[[1-(diméthylamino) cyclohexyl] méthyl] benzamide"

Alfentanil
Allylprodine
Alphacétylméthadol
Alphaméprodine
Alphaméthadol
Alphaméthylfentanyl

Alphaprodine
Aniléridine
Benzéthidine
Benzylmorphine
Béta-hydroxyfentanyl
Béta-hydroxy-méthyl-3-fentanyl
Bétacétylméthadol
Bétaméprodine
Bétaméthadol
Bétaprodine
Bezitramide

Butyrate de dioxaphétyl

Butyrfentanyl ou Butyrylfentanyl ou N-Phényl-N-[1-(2-phenylethyl)-4-pipéridinyl] butanamide
 Cannabis et résine de cannabis
 Cétobémidone
 Clonitazène
 Coca, feuille de
 Cocaïne
 Codoxime
 Concentré de paille de pavot ou matière obtenue lorsque la paille de pavot a subi un traitement en vue de la concentration de ses alcaloïdes (capsules, tiges)
 Désomorphine
 Dextromoramide
 Diampromide
 Diéthylthiambutène
 Difénoxine
 Dihydroétorphine (13)
 Dihydromorphine
 Diménoxadol
 Dimépheptanol
 Diméthylthiambutène

Diphénoxylate, à l'exception des préparations orales en renfermant par dose unitaire, une quantité maximale de 2,5 mg calculés en base en association avec une quantité d'au moins 0,025 mg de sulfate d'atropine

Dipipanone
 Drotébanol
 Ecgonine, ses esters et ses dérivés transformables en ecgonine et cocaïne
 Ethylméthylthiambutène
 Etonitazène
 Etorphine
 Etoxéridine
 Fentanyl
 Furéthidine
 Héroïne
 Hydrocodone
 Hydromorphinol
 Hydromorphone
 Hydroxypéthidine
 Isométhadone
 Lévométhorphane, à l'exception de son isomère dextrogyre ou dextrométhorphane
 Lévomoramide
 Lévophénacilmorphane
 Lévorphanol, à l'exception de son isomère dextrogyre ou dextrorphanol
 Métazocine
 Méthadone et son intermédiaire ou cyano-4 diméthylamino-2 diphényl-4,4 butane
 Méthylésorphine
 Méthyldihydromorphine
 Méthyl-3-thiofentanyl
 Méthyl-3-fentanyl
 Métopon
 Moramide (intermédiaire du) ou acide méthyl-2 morpholino-3 diphényl-1,1 propane carboxylique
 Morphéridine

Morphine (y compris les préparations d'opium en renfermant plus de 20 p. 100 exprimé en base anhydre et les dérivés morphiniques à azote pentavalent tel méthobromure, N-oxymorphine, N-oxycodéine), à l'exception des éthers nommément mentionnés à l'annexe II et des préparations relevant d'un autre classement

MPPP ou propionate de méthyl-1 phényl-4 pipéridinyle-4

Myrophine
 Nicomorphine
 Noracyméthadol
 Norlévorphanol
 Norméthadone
 Normorphine
 Norpipanone
 Opium (y compris les préparations d'opium et de papaver somniferum renfermant jusqu'à 20 p. 100 de morphine calculée en base anhydre, à l'exception des préparations relevant d'un autre classement)
 Oripavine
 Oxycodone
 Oxymorphone
 Para-fluorofentanyl
 PEPAP ou acétate de phénéthyl-1 phényl-4 pipéridinyle-4
 Péthidine et ses intermédiaires A (cyano-4 méthyl-1 phényl-4 pipéridine) B (ester éthylique de l'acide phényl-4 pipéridine)

carboxylique-4) et C (acide méthyl-1 phényl-4 pipéridine carboxylique-4)
Phénadoxone
Phénampromide
Phénazocine
Phénomorphane
Phénopéridine
Piminodine
Piritramide
Proheptazine
Propéridine
Racéméthorphane
Racémorphane
Rémifentanil, ses isomères, ses esters, éthers et sels dans tous les cas où ils peuvent exister
Sufentanil
Thébacone
Thébaïne
Thiofentanyl
Tilidine
Trimépéridine

U-47700 ou 3,4-dichloro-N-[2-(diméthylamino) cyclohexyl]-N-méthylbenzamide

-acryl (oyl) fentanyl

-carfentanil ou carfentanyl

-Furanylfentanyl ou N-phenyl-N-[1-(2-phenylethyl) piperidin-4-yl] furan-2-carboxamideocfentanil ou ofentanyl ;

-para-fluoroisobutyr (yl) fentanyl ou pFIBF ou 4-fluoroisobutyr (yl) fentanyl ou 4 FIBF ;

-tetrahydrofuranylfentanyl ou THF-F ;

-Methoxyacetylfentanyl ou 2-methoxy-N-phenyl-N-[1-(2-phenylethyl) piperidin-4-yl] acetamide,

-Cyclopropylfentanyl ou (d) N-phenyl-N-[1-(2-phenylethyl) piperidin-4-yl] cyclopropanecarboxamide,

-Parafluorobutyrylfentanyl,

-Orthofluorofentanyl

Annexe 2. Arrêté du 13 décembre 2016 sur les modalités de dépistage des stupéfiants lors de contrôle routier

Décrets, arrêtés, circulaires

TEXTES GÉNÉRAUX

MINISTÈRE DES AFFAIRES SOCIALES ET DE LA SANTÉ

Arrêté du 13 décembre 2016 fixant les modalités du dépistage des substances témoignant de l'usage de stupéfiants, et des analyses et examens prévus par le code de la route et abrogeant l'arrêté du 5 septembre 2001 modifié fixant les modalités du dépistage des substances témoignant de l'usage de stupéfiants, et des analyses et examens prévus par le code de la route

NOR : AFSP1636875A

La ministre des affaires sociales et de la santé, le garde des sceaux, ministre de la justice, et le ministre de l'intérieur,

Vu le code de la route, notamment son article L. 235-1 ;

Vu le code de la santé publique ;

Vu le code de procédure pénale ;

Vu le décret n° 2016-1152 du 24 août 2016 relatif à la lutte contre la conduite après usage de substances ou plantes classées comme stupéfiants ;

Vu l'arrêté du 5 septembre 2001 modifié fixant les modalités du dépistage des substances témoignant de l'usage de stupéfiants, et des analyses et examens prévus par le code de la route ;

Vu l'avis du directeur général de l'Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé en date du 25 octobre 2016,

Arrêtent :

Section 1

Modalités relatives aux épreuves de dépistage

Art. 1^{er}. – Les épreuves de dépistage prévues aux articles R. 235-3 et R. 235-4 du code de la route consistent, à partir d'un recueil salivaire ou urinaire, à rechercher la présence d'une ou plusieurs substances témoignant de l'usage de stupéfiants appartenant aux quatre familles suivantes : cannabiniqes, amphétaminiques, cocaïniqes, opiacés.

Art. 2. – Le recueil salivaire s'effectue dans les conditions prévues dans la notice du test de dépistage utilisé.

Le recueil urinaire s'effectue dans un flacon muni d'un couvercle en assurant l'étanchéité, sans additif, incassable et d'une contenance au moins égale à 100 millilitres.

Art. 3. – I. – Le dépistage, à partir d'un recueil salivaire, est réalisé au moyen de tests salivaires respectant les seuils minima de détection suivants :

1^o S'agissant des cannabiniqes :

– 9-tétrahydrocannabinol (THC) : 15 ng/ml de salive ;

2^o S'agissant des amphétaminiques :

– amphétamine : 50 ng/ml de salive ;

– métamphétamine : 50 ng/ml de salive ;

– méthylène dioxymétamphétamine (MDMA) : 50 ng/ml de salive ;

3^o S'agissant des cocaïniqes :

– cocaïne ou benzoylecgonine : 10 ng/ml de salive ;

4^o S'agissant des opiacés :

– morphine : 10 ng/ml de salive ;

– 6 mono acétylmorphine : 10 ng/ml de salive.

II. – Le dépistage, à partir d'un recueil urinaire, est réalisé au moyen de tests de dépistage respectant les seuils minima de détection suivants :

1° S'agissant des cannabiniqes :

– acide carboxylique du tétrahydrocannabinol (9 THCCOOH) : 50 ng/ml d'urine ;

2° S'agissant des amphétaminiques :

– amphétamine : 1 000 ng/ml d'urine ;

– métamphétamine : 1 000 ng/ml d'urine ;

– méthylène dioxymétamphétamine (MDMA) : 1 000 ng/ml d'urine ;

3° S'agissant des cocaïniques :

– cocaïne ou benzoylecgonine : 300 ng/ml d'urine ;

4° S'agissant des opiacés :

– morphine : 300 ng/ml d'urine.

Art. 4. – Les tests de dépistage urinaire peuvent être acquis et détenus par les forces de l'ordre pour l'usage exclusif du médecin requis conformément à l'article R. 235-3 du code de la route.

Section 2

Modalités relatives aux analyses et examens

Art. 5. – Le prélèvement salivaire ou sanguin, prévu aux articles R. 235-5 et R. 235-6 du code de la route, est destiné à la recherche et à la confirmation de la présence d'un ou plusieurs produits stupéfiants tels que définis à l'article 1^{er}.

Art. 6. – En cas de prélèvement salivaire, prévu au I de l'article R. 235-6 du code de la route, le nécessaire mis à disposition de l'officier ou l'agent de police judiciaire pour le prélèvement, comprend :

– un collecteur destiné au recueil de la salive et des cellules buccales ;

– un flacon ou tube permettant la conservation du prélèvement ;

– une enveloppe de conditionnement destinée à enfermer et identifier le prélèvement.

En cas de demande du conducteur d'un prélèvement sanguin en vue d'un examen technique ou d'une expertise, prévu au troisième alinéa du I de l'article R. 235-6 du code de la route, le nécessaire mis à disposition du praticien chargé d'effectuer le prélèvement comprend :

– un tampon de stérilisation sans alcool ;

– un tube à prélèvement sous vide de 10 ml avec héparinate de lithium et étiquettes ;

– une aiguille à prélèvement sous vide qui accompagne le tube de prélèvement avec l'adaptateur adéquat ;

– un contenant permettant l'apposition d'un scellé et la protection du tube à prélèvement sous vide.

En cas de prélèvement sanguin, prévu au II de l'article R. 235-6 du code de la route, le nécessaire mis à disposition du praticien, chargé d'effectuer le prélèvement, comprend :

– un tampon de stérilisation sans alcool ;

– deux tubes à prélèvement sous vide de 10 ml avec héparinate de lithium et étiquette ;

– une aiguille à prélèvement sous vide qui accompagne le tube de prélèvement avec l'adaptateur adéquat ;

– deux contenants permettant l'apposition d'un scellé et la protection du tube à prélèvement sous vide.

Art. 7. – La salive est prélevée grâce à un collecteur placé dans la cavité buccale selon la procédure indiquée sur la notice d'emploi. Le prélèvement doit être effectué par le conducteur lui-même, sous le contrôle de l'officier ou l'agent de police judiciaire.

Le sang est prélevé par ponction veineuse dans le tube à prélèvement sous vide. Le ou les tubes sont agités par retournement pour prévenir la coagulation du sang.

Art. 8. – Le prélèvement et la conservation des échantillons sanguins en cas de décès du ou des conducteurs impliqués, prévus à l'article R. 235-8 du code de la route, sont pratiqués par prélèvement de sang veineux périphérique au niveau d'une veine fémorale ou sous-clavière, ou de sang intracardiaque, sur fluorure de sodium dans chacun des deux flacons en verre avec capsule de téflon et bouchon à vis.

Art. 9. – La recherche et la confirmation des produits stupéfiants dans le sang ou dans la salive, prévus à l'article R. 235-10 du code de la route, s'effectuent en utilisant la technique dite « de chromatographie couplée à la spectrométrie de masse ».

Art. 10. – Les analyses sont exécutées avec des matériels et des méthodes respectant les seuils minima de détection suivants :

I. – En cas d'analyse salivaire :

1° S'agissant des cannabiniqes :

– 9-tétrahydrocannabinol (THC) : 1 ng/ml de salive (ou équivalent) ;

2° S'agissant des amphétaminiques :

- amphétamine : 10 ng/ml de salive (ou équivalent) ;
- métamphétamine : 10 ng/ml de salive (ou équivalent) ;
- méthylène dioxymétamphétamine (MDMA) : 10 ng/ml de salive (ou équivalent) ;
- 3,4-méthylènedioxyamphétamine (MDA) : 10 ng/ml de salive (ou équivalent) ;
- 3,4-méthylènedioxy-N-éthylamphétamine (MDEA) : 10 ng/ml de salive (ou équivalent) ;

3° S'agissant des cocaïnes :

- cocaïne : 10 ng/ml de salive (ou équivalent) ;
- benzoylecgonine : 10 ng/ml de salive (ou équivalent) ;

4° S'agissant des opiacés :

- 6-mono acétylmorphine : 10 ng/ml de salive (ou équivalent) ;
- morphine : 10 ng/ml de salive (ou équivalent).

II. – En cas d'analyse sanguine :

1° S'agissant des cannabiniques :

- 9-tétrahydrocannabinol (THC) : 0,5 ng/ml de sang ;

2° S'agissant des amphétaminiques :

- amphétamine : 10 ng/ml de sang ;
- métamphétamine : 10 ng/ml de sang ;
- méthylène dioxymétamphétamine (MDMA) : 10 ng/ml de sang ;
- 3,4-méthylènedioxyamphétamine (MDA) : 10 ng/ml de sang ;
- 3,4-méthylènedioxy-N-éthylamphétamine (MDEA) : 10 ng/ml de sang ;

3° S'agissant des cocaïnes :

- cocaïne : 10 ng/ml de sang ;
- benzoylecgonine : 10 ng/ml de sang ;

4° S'agissant des opiacés :

- 6-mono acétylmorphine : 10 ng/ml de sang ;
- morphine : 10 ng/ml de sang.

Art. 11. – La recherche dans le sang des médicaments psychoactifs ayant des effets sur la capacité de conduire des véhicules est effectuée, à la demande du conducteur, en utilisant au moins une technique dite de « chromatographie couplée à la spectrométrie de masse ».

Art. 12. – Les analyses ou examens biologiques prévus aux articles R. 235-5 à R. 235-10 du code de la route sont effectuées par :

1° Un médecin ou un pharmacien exerçant dans un laboratoire de police scientifique ;

2° Un expert inscrit en toxicologie dans l'une des listes instituées en application de l'article 2 de la loi n° 71-498 du 29 juin 1971 relative aux experts judiciaires et à l'article 157 du code de procédure pénale, dans les conditions prévues par l'article R. 3354-20 du code de la santé publique ;

3° Un biologiste médical d'un laboratoire de biologie médicale répondant aux conditions fixées par les articles L. 6213-1 et L. 6213-2 du code de la santé publique ;

Ces personnes doivent justifier de travaux et d'expérience dans les activités de toxicologie ou d'une pratique des analyses en toxicologie médico-légale d'au moins trois ans.

Art. 13. – Les laboratoires mentionnés à l'article R. 235-9 du code de la route doivent disposer des installations, de l'appareillage, du matériel, des produits et du personnel nécessaires à la réalisation d'analyses selon les méthodes prévues aux articles 9 et 11 du présent arrêté, permettant la recherche des produits stupéfiants et la recherche et le dosage des médicaments psychoactifs dans les liquides biologiques.

Ils doivent également disposer des installations, de l'appareillage, du matériel, des produits nécessaires à la conservation des échantillons à – 20 °C pendant au moins un an et se soumettre au contrôle de qualité exécuté par un organisme d'évaluation externe de la qualité.

Les laboratoires de police scientifique devront faire l'objet d'une accréditation selon la norme NF-EN-ISO n° 17025 avant le 31 octobre 2022.

Les laboratoires de biologie médicale sont accrédités conformément aux dispositions de l'article L. 6221-1 du code de la santé publique et au I de l'article 7 de l'ordonnance n° 2010-49 du 13 janvier 2010 modifiée.

Section 3

Dispositions finales

Art. 14. – L'arrêté du 5 septembre 2001 susvisé est abrogé.

Les dispositions relatives à la Nouvelle-Calédonie, à la Polynésie française et aux îles Wallis et Futuna prévues par l'arrêté du 5 septembre 2001 susvisé demeurent applicables dans leur rédaction antérieure à l'abrogation de cet arrêté.

Art. 15. – Le directeur général de la santé, le directeur des affaires criminelles et des grâces et le délégué à la sécurité et à la circulation routières sont chargés, chacun en ce qui le concerne, de l'exécution du présent arrêté, qui sera publié au *Journal officiel* de la République française.

Fait le 13 décembre 2016.

*Le garde des sceaux,
ministre de la justice,*
Pour le ministre et par délégation :
*Le directeur des affaires criminelles
et des grâces,*
R. GELLI

*La ministre des affaires sociales
et de la santé,*
Pour la ministre et par délégation :
Le directeur général de la santé,
B. VALLET

Le ministre de l'intérieur,
Pour le ministre et par délégation :
*Le délégué à la sécurité
et à la circulation routières,*
E. BARBE

Annexe 3. Publication de la méthode PESI-HRMS appliquée à la recherche de cocaïne et dérivé dans la salive

Abstract

Introduction: Probe Electrospray Ionization (PESI) is an atmospheric pressure ionization method that can be directly coupled with a mass spectrometer and that allows ultrafast analyses without chromatographic separation and with minimal sample preparation. The main objective of the present study was to develop a method for the measurement of cocaine derivatives in oral fluid by coupling a PESI source with a quadrupole time-of-flight (QTOF).

Material and Methods: Three cocaine derivatives were considered: benzoylecgonine (BZE), cocaine and ecgoninemethylester (EME). A QTOF mass spectrometer LCMS-9030 (Shimadzu®) was used. The approach consisted in a full-mass scan ("untargeted approach" from 100 to 500 m/z ; MS1) followed by a targeted scheduled MSMS acquisition (precursor ions of the 3 molecules and their 3 internal standards; MS2). To synchronize ionization at the surface of the probe with MS system acquisition, multiple parameters had to be adjusted, among which: total time for probe movement (i.e., its frequency) ; event times of MS1 and MS2. Eighty-three Driving Under the Influence of Drug (DUID) cases sent to our Lab for the determination of illicit drugs were analyzed using the PESI-QTOF method and a LC-MS/MS method.

Results: The best sample preparation conditions were obtained by a simple dilution of 100 μL of saliva in an ethanol / 10 mM ammonium formate buffer (50/50). Ten μL of sample were deposited on a dedicated sample plate and introduced into the PESI source. The best compromise between satisfactory peak shapes and total area of the signal was obtained for a 0-45 seconds interval with: total time for probe movement = 430 ms (i.e., frequency = 2.3 Hz); event time for full-scan of 50 ms and event time for MSMS of 50 ms, which corresponded to a loop-time of 150 ms (3 different event times performed simultaneously). The method was entirely validated according to ISO15189 standard for a 5-100 ng/mL range, including accuracy and precision, matrix effect, carryover and specificity. The LLOD values were 1 ng/mL while 10 ng/mL are required by law. A perfect agreement was observed between the PESI-QTOF and the LC-MS/MS methods for the 3 cocaine derivatives in the 83 DUID cases, whether the cases were positive or negative. Cocaine was detected in 51 out of these 83 real cases (61.6%). BZE and EME were also simultaneously detected in 50 of them (98.5%).

Discussion- conclusion: These works, though limited to cocaine derivatives in oral fluid, demonstrate that an original analytical tool combining the easiness and rapidness of a PESI source with selectivity and sensitivity of a QTOF, was able to specifically identify and precisely quantitate compounds of interest in 45 seconds, with pretty low LLOD and LLOQ values. Respective advantages of PESI (ultrafast analysis, no chromatographic separation, simple sample preparation) and HRMS can be combined

Serment De Galien

Je jure en présence de mes Maîtres de la Faculté et de mes condisciples :

- d'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;
- d'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;
- de ne jamais oublier ma responsabilité, mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères, si j'y manque.

Couplage d'une source Probe Electrospray Ionization à un spectromètre de masse de haute résolution (PESi-HRMS) : application à la recherche de stupéfiants dans la salive

Lorsqu'il s'agit de contrôle routier, la loi prévoit une confirmation de la conduite d'un véhicule après usage de stupéfiants si celui-ci se révèle positif lors du contrôle. La confirmation se fait via un prélèvement salivaire de type FloqSwab[®] analysé en laboratoire par des méthodes de LC-MS/MS. La source de type Probe ElectroSpray Ionization (PESI) est une méthode d'ionisation ultrarapide à pression atmosphérique permettant de s'affranchir d'une séparation en chromatographie. Notre objectif était de développer une méthode de dosage des stupéfiants dans la salive en couplant une source PESI à un spectromètre de masse haute résolution (HRMS). Le travail d'optimisation a permis d'élaborer un protocole de préparation d'échantillon minimal : 50 µL de salive sont mélangés dans un tampon éthanol/formiate d'ammonium. Après ajout des étalons deutérés, 10 µL sont déposés sur une plaque d'échantillonnage dans la source PESI. L'acquisition spectrale se fait selon un mode "MS/MS" avec 1 transition de confirmation par molécule. Le temps d'analyse est de 1,5 minute. Suivant la norme ISO 15189 (COFRAC), la validation a inclus notamment une détermination des limites de détection (LDD) et de quantification (LDQ), une analyse de répétabilité et reproductibilité. La méthode a été validée avec succès pour 9 molécules de la classe des opiacés, des amphétaminiques et des dérivés de la cocaïne. Notamment, les LDD étaient inférieures à 10 ng/mL, conformément aux exigences de la loi. Pour 83 échantillons réels issus de l'activité de routine du laboratoire, la méthode PESI-HRMS a retrouvé les mêmes résultats qu'une méthode de LC-MS/MS accréditée et utilisée en routine. Dans la perspective envisagée pour la poursuite de ces travaux, une méthode THC dans la salive devra être développée pour répondre complètement aux exigences de la loi concernant la surveillance de l'usage de stupéfiants dans le cadre de la conduite automobile.

Mots-clés : PESI, HRMS, Stupéfiants

Probe Electrospray Ionization source coupled to a high-resolution mass spectrometer (PESi-HRMS): application to the search for narcotics in saliva

In France, a positive roadside test to Driving Under the Influence of Drugs (DUID) has to be performed in an authorized laboratory using a LC-MS/MS method. The Probe ElectroSpray Ionization (PESI) source is an ultra-fast ionization method at atmospheric pressure that needs no chromatographic separation and requires a minimal sample preparation. Our aim was to develop a method for the determination of illicit drugs in saliva by coupling PESI with high-resolution mass spectrometry (HRMS). The optimization work carried out enabled us to develop a minimal sample preparation protocol: 50 µL of saliva are mixed in an ethanol/ammonium formate buffer. After addition of the deuterated standards, 10 µL of the mixture are placed on a sample plate in the PESI source. Spectral acquisition is carried out in MS/MS mode, with 1 confirmation transition per molecule. The analysis time following this procedure was 1.5 minutes. The method was then validated in accordance with ISO 15189 (COFRAC) requirements. Validation included determination of the limits of detection (LOD) and quantification (LOQ), and an analysis of repeatability and reproducibility. The method was successfully validated for 9 molecules from the class of opiates, amphetamines, and cocaine derivatives. Importantly, the LDDs were below 10 ng/mL, in line with legal requirements. For 83 real samples from the laboratory's routine activity, the PESI-HRMS method was in perfect agreement with an accredited LC-MS/MS method routinely employed in the Lab. In the course of this work, the development of a THC method in saliva is ongoing and will be added to the final method to fully fit the expectations of the French law.

Keywords : PESI, HRMS, narcotics

